Postverlagsort Berlin

PLANTA

ARCHIV FÜR WISSENSCHAFTLICHE BOTANIK

UNTER MITWIRKUNG VON

J. BONNER-PASADENA, **E. BÜNNING**-TÜBINGEN, **A. ERNST**-ZÜRICH
H. v. GUTTENBERG-ROSTOCK, **R. HARDER**-GÖTTINGEN
W. SCHUMACHER-BONN

HERAUSGEGEBEN VON

WILHELM RUHLAND UND **OTTO RENNER**

47. BAND, 2. HEFT

MIT 65 TEXTABBILDUNGEN

(ABGESCHLOSSEN AM 15. MAI 1956)

SPRINGER-VERLAG
BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG
1956

Planta (Berl.)

Preis DM 22.80

Planta. Archiv für wissenschaftliche Botanik

Begründet 1925. Herausgegeben von *W. Ruhland*, *H. Winkler*. Berlin, Springer. Bis Band 21 als „Zeitschrift für wissenschaftliche Biologie, Abteilung E: Planta".

Die Zeitschrift **„Planta"**, Archiv für wissenschaftliche Botanik, steht in deutscher Sprache oder einer der Kongreßsprachen, sofern sie die Muttersprache des Autors ist, abgefaßten Originalarbeiten aus dem Gesamtgebiet der Botanik, abgesehen von solchen rein systematischen oder floristischen Inhalts, offen.

Arbeiten, welche einen Vermerk des Verfassers „Kurze Mitteilung" tragen, werden sobald wie möglich außerhalb der Reihenfolge des Eingangs abgedruckt. Ihr Umfang darf 4 Druckseiten nicht überschreiten; die Beigabe von Abbildungen ist nur in Ausnahmefällen angängig.

Die Zeitschrift erscheint zur Ermöglichung raschester Veröffentlichung zwanglos in einzeln berechneten Heften, die zu Bänden vereinigt werden.

Der Autor erhält einen Unkostenersatz von DM 20.— für den 16seitigen Druckbogen, jedoch im Höchstfalle DM 60.— für eine Arbeit. Für „Kurze Mitteilungen" wird ein Unkostenersatz nicht erstattet.

Es wird ausdrücklich darauf aufmerksam gemacht, daß mit der Annahme des Manuskriptes und seiner Veröffentlichung durch den Verlag das ausschließliche Verlagsrecht für alle Sprachen und Länder an den Verlag übergeht. Grundsätzlich dürfen nur Arbeiten eingereicht werden, die vorher weder im Inland noch im Ausland veröffentlicht worden sind, und die auch nachträglich nicht anderweitig zu veröffentlichen der Autor sich verpflichtet.

Es ist ferner ohne ausdrückliche Genehmigung des Verlages nicht gestattet, photographische Vervielfältigungen, Mikrofilme, Mikrophote u. ä. von den Zeitschriftenheften, von einzelnen Beiträgen oder von Teilen daraus herzustellen.

Die Mitarbeiter erhalten von ihrer Arbeit bis auf weiteres zusammen 75 Sonderdrucke unentgeltlich.

Aufnahmebedingungen siehe 3. Umschlagseite.

Alle Manuskripte und Anfragen sind zu richten an

Professor Dr. Wilhelm Ruhland, (14a) *Unterdeufstetten über Crailsheim*, oder an *Professor Dr. Otto Renner*, (13b) *München 38, Botanische Staatsanstalten, Menzinger Straße 67.*

Springer-Verlag

Berlin W 35, Reichpietschufer 20, Fernsprecher 249251

und

Heidelberg, Neuenheimer Landstr. 24, Fernsprecher 27901

---

47. Band **Inhaltsverzeichnis** 2. Heft

Seite

FREY-WYSSLING, A., H. H. BOSSHARD und K. MÜHLETHALER, Die submikroskopische Entwicklung der Hoftüpfel. Mit 3 Textabbildungen, in 12 Einzeldarstellungen 115

MOHR, H., Die Abhängigkeit des Protonemawachstums und der Protonemapolarität bei Farnen vom Licht. Mit 36 Textabbildungen 127

KÖHLER, D., Über die Beziehungen zwischen der Länge von Haferkoleoptilen und der Wachstumsgeschwindigkeit ihrer isolierten Ausschnitte. Mit 6 Textabbildungen 159

SCHWINCK, L., Nachweis von Adenosintriphosphorsäure (ATP) in Grünalgen und Helodea sowie Einbau von radioaktivem Phosphor (^{32}P) bei der Photosynthese. Mit 20 Textabbildungen 165

Planta, Bd. 47, S. 115—126 (1956)

Aus dem Institut für Allgemeine Botanik
der Eidgenössischen Technischen Hochschule Zürich

DIE SUBMIKROSKOPISCHE ENTWICKLUNG DER HOFTÜPFEL*

Von

A. Frey-Wyssling, H. H. Bosshard und K. Mühlethaler

Mit 3 Textabbildungen, in 12 Einzeldarstellungen

(Eingegangen am 30. November 1955)

Problemstellung und Untersuchungsmethode

Der submikroskopische Schichtenbau (Kerr u. Bailey 1934) und der submikroskopische Feinbau der Hoftüpfel (Harada u. Miyazaki 1952, Liese u. Hartmann-Fahnenbrock 1953, Frey-Wyssling u. Bosshard 1953, Eicke 1954) sind weitgehend abgeklärt. Strittig bleibt die Frage, welcher Natur die Mikrofibrillen sind, die die gegen 1 μ breiten und mehrere μ langen Porenspalten zwischen den radialen Spangen der Schließhaut („Haltefäden des Torus") quer überspannen.

Trotzdem wir die Querfibrillen auf Feinschnitten einwandfrei abgebildet (Frey-Wyssling u. Bosshard) und später auch mit dem Abdruckverfahren gefunden haben (Frey-Wyssling, Mühlethaler u. Bosshard 1955, Fig. 4), schreiben Liese u. Johann (1954), daß wir diese Strukturen „annehmen". Auf solcher Grundlage ist natürlich eine Diskussion unmöglich, denn man kann objektive Tatbestände nicht einfach negieren, sondern man muß abklären, warum in gewissen Fällen eine Porenauskleidung fehlt, in anderen dagegen sichtbar wird. Um so mehr, wenn es sich um eine theoretisch so wichtige Frage handelt wie im vorliegenden Falle. Denn wenn die Schließhäute der Coniferenhoftüpfel offene Poren von der Größenordnung 1 $\mu \times 3\,\mu$ besitzen, liegen offene mikroskopische Zellverbindungen vor, die in der Anatomie als Zellfusionen bezeichnet werden. Da nun fusionierte Wasserleitungszellen Gefäße vorstellen und daher als vasculäre Elemente oder Tracheen prinzipiell von den cellulären Tracheiden abgetrennt werden, würden so große Schließhautdurchbrechungen, die den Dimensionen der Schlitze kleiner Leitergefäße nahe kommen, die Gegenüberstellung der vasculären und der cellulären Wasserleitung hinfällig machen, durch die die Angiospermen funktionell von den Gymnospermen abgetrennt werden. Aus diesem Grunde haben wir die Entwicklung der Hoftüpfel im Elektronenmikroskop genau verfolgt, um das Schicksal der Mikrofibrillen abzuklären.

* Aus Mitteln des Schweiz. Nationalfonds durchgeführte Untersuchung. Wir möchten den zuständigen Behörden auch hier unseren Dank aussprechen.

Als Material dienten in erster Linie primäre und sekundäre Tracheiden von *Pinus silvestris* L. während ihrer Differenzieung. Dieses Material erlaubt, gleichzeitig und vergleichend auch die Bildung der großen, für *Pinus* charakteristischen Fenstertüpfel zu studieren. Das Altern der Hoftüpfel wurde bei *Abies alba* Miller mit der Abdruckmethode bis zum 18. Jahrring verfolgt. Die primären Tracheiden wurden dem Meristem unter der Vegetationsspitze und die sekundären der dem Cambium benachbarten Schicht entnommen. Zur Darstellung der submikroskopischen Fibrillentextur wurde neben der Feinschnitt- und der Abdruckmethode vor allem die Zellmacerierung verwendet (Mühlethaler 1950b), die bei so jungen Zellwänden genügend dünne Präparate und vor allem sehr gute Übersichtsbilder liefert. Ein Nachteil der Macerationsmethode liegt allerdings darin, daß die isolierten Zellen kollabieren, so daß immer zwei Zellwände übereinander liegen. Mit Hilfe von Feinschnitt- und Abdruckpräparaten muß daher stets vergleichend festgestellt werden, was zur oberen und was zur darunter liegenden Zellwand gehört.

Entwicklung der Schließhaut

Die Schließhaut der Hoftüpfel besteht aus radialen Fäden, an denen der Torus aufgehängt ist. Diese Fäden sind von mikroskopischer Dicke, denn sie wurden im Lichtmikroskop bereits von Russow (1883) gesehen, als feine radiale Streifung gedeutet und vollkommen richtig als Fäden abgebildet (s. Fig. 35 in Russow). Bailey (1913) hat nachgewiesen, daß zwischen den radialen Fäden Öffnungen vorkommen müssen. Im Elektronenmikroskop erweist sich das Lumen zwischen den radialen Fäden als leer (Liese u. Fahnenbrock 1952) oder durch Querfibrillen unterteilt (Frey-Wyssling u. Bosshard). Die Schließhaut und der Torus werden als Bildungen der Primärwand betrachtet (Kerr u. Bailey; Esau 1953, wo allerdings in Fig. 34 die Primärwand nur bis zur Tüpfelkammer richtig angedeutet ist, so daß man die Schließhaut als zur Mittellamelle gehörig auffassen könnte).

Es fragt sich nun, wie früh die Differenzierungen der Schließhaut in der Primärwand auftreten. Primäre Tracheiden, die sich in der Phase des bipolaren Spitzenwachstums befinden, zeigen an ihren Zellenden noch kaum Andeutungen von Tüpfelbildungen. Die gesamte Wand besteht aus einem gleichmäßigen Flechtwerk von Mikrofibrillen. Erst wenn die Zone des Spitzenwachstums weitergerückt ist und die betreffende Zellregion also das Flächenwachstum eingestellt hat, treten deutliche Differenzierungen auf (Fig. 1, 2). Sie bestehen in einer Zusammenraffung bereits vorhandener Fibrillen zu etwas derberen Strängen. Fig. 1 zeigt zahlreiche solche Differenzierungen in einer primären Jungtracheide, die ihr Spitzenwachstum abgeschlossen hat, aber noch

nicht zur Bildung der Sekundärwand übergegangen ist. Da die Tüpfelbildung von zwei benachbarten Zellen an der gleichen Stelle in Angriff genommen werden muß, kann sie nur dort erfolgen, wo sich die durch das lokale Spitzenwachstum bedingten Wandverschiebungen beruhigt haben.

Bei den wesentlich breiteren Hoftüpfeln der sekundären Tracheiden haben wir ebenfalls eine Raffung der Primärfibrillen beobachtet, doch tritt sie erst nach der Anlage der Sekundärwand auf. Fig. 6 zeigt die Anlage von zwei Hoftüpfeln. In den beiden Hoftüpfeln ist die Differenzierung verschieden weit fortgeschritten. Beim rechten Tüpfel der Fig. 6 hat sie eben erst eingesetzt, denn man erkennt im Zentrum die ungestörte Streuungstextur der Primärwand, während gegen den Rand des Feldes gewisse Auflockerungen auftreten. Das etwas spätere Stadium des linken Tüpfels zeigt, wie die ursprünglich streuenden Mikrofibrillen zu radialen Strängen zusammengeschoben werden. Dies ist besonders schön aus Fig. 3 ersichtlich. Von dieser Raffung nicht erfaßt werden Fibrillen, deren Verlauf wesentlich mehr als 45° von der Radialrichtung abweicht. Diese verbleiben in ihrer annähernd tangentialen Lage, wodurch Bilder wie Fig. 5 entstehen: zusammengeschobene und daher gebündelte Radialstränge und viel feinere tangentiale Querspangen. Wahrscheinlich werden die radialen Haltefäden noch zusätzlich durch neu gebildete Mikrofibrillen verstärkt. Aus den Bildern 3, 5 und 6 geht indessen sicher hervor, daß eine mechanische Fibrillenverschiebung und Fibrillenbündelung (besonders schön in Fig. 5 zu sehen) ein wesentliches Merkmal der Schließhaut-Differenzierung ist.

Differenzierung des Torus

Nachdem der Rand der Schließhaut in der angegebenen Weise aufgelockert worden ist, beobachtet man eine Verstärkung der zentralen Partie durch Anlagerung neuer Netzgeflechte. Diese verdichtete Zellwandpartie wird dann durch circular angelegte Mikrofibrillen umgrenzt (Fig. 7). Man erkennt, daß die Circularfibrillen auf das Netzwerk, aus dem die Haltefäden entspringen, aufgelagert sind. Die Circulartextur wird nach innen weitergebaut, wie aus Fig. 5 hervorgeht. Durch die Dickenzunahme des Torus wird seiner Durchstrahlbarkeit im Elektronenmikroskop jedoch bald eine Grenze gesetzt. Der Torus ist sicher nicht strukturlos, wie Liese u. Fahnenbrock angeben, denn seine Peripherie zeigt eine deutliche circulare Paralleltextur. Man kann sich fragen, ob der Torus zur Primärwand zu rechnen sei (Kerr u. Bailey) oder ob man ihn als eine Bildung mit Paralleltextur der Sekundärwand zuweisen soll. Dies ist eine Frage der Definition. Wenn man die Streuungstextur als primär, die Paralleltextur dagegen als sekundär auffaßt, müßte man den Torus eher als eine sekundäre Bildung bezeichnen.

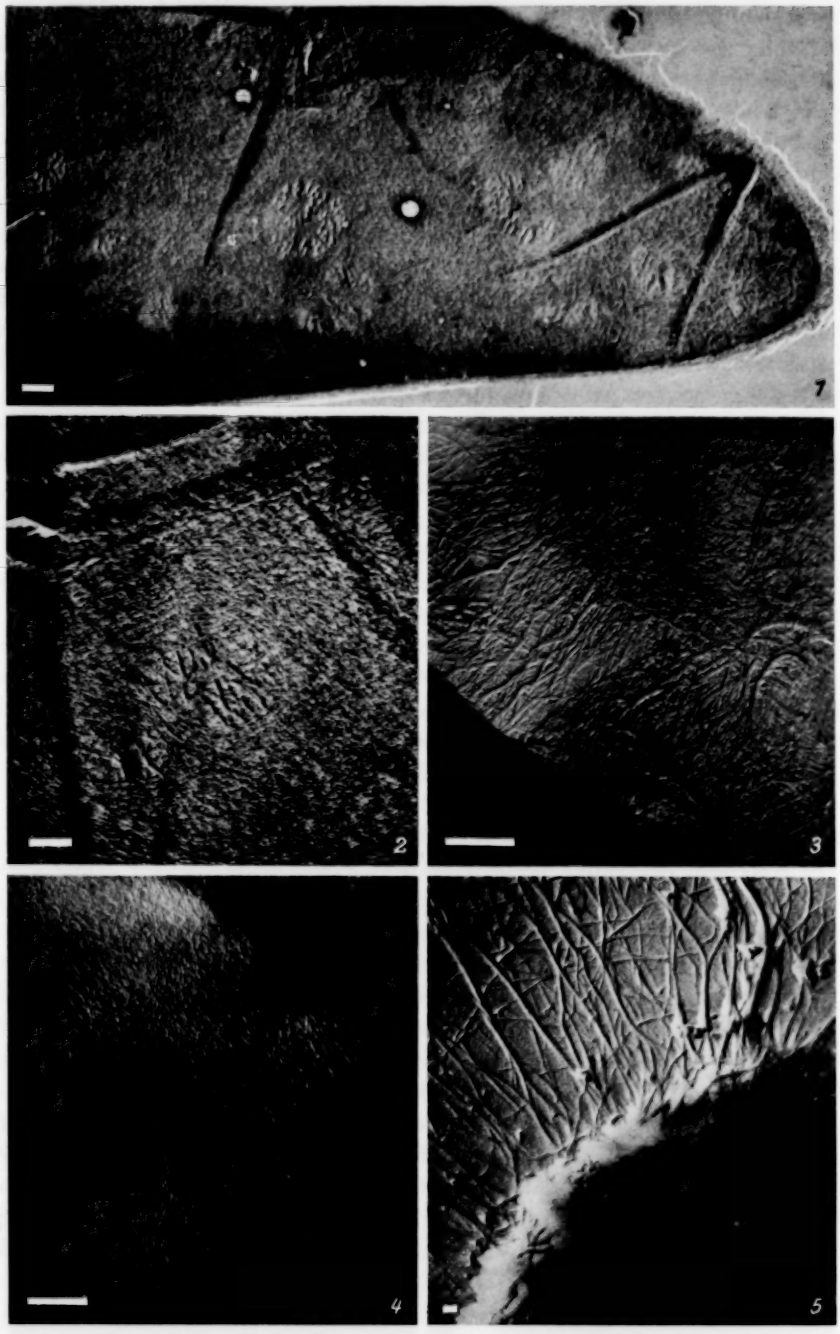

Abb. 1. Fig. 1—5. (Legende s. Seite 119)

Wie Fig. 8 zeigt, ist der Torus aus zwei Hälften zusammengesetzt, die von den beiden benachbarten Zellen aufgebaut werden und durch die Mittelschicht, d. h. ursprüngliche Mittellamelle + Primärwände, geschieden bleiben. Es ergibt sich nun die Frage, ob auch die Haltefäden der Schließhaut eine solche Doppelnatur besitzen oder ob sie nur aus Mikrofibrillen der einen oder der anderen der beiden ursprünglichen Primärlamellen hervorgehen; in diesem Falle müßte man zwischen Radialsträngen der einen oder der anderen Zelle unterscheiden. Die Erfahrung zeigt indessen, daß wahrscheinlich bei der Raffung die Mikrofibrillen der beiden Primärwände nicht säuberlich geschieden bleiben, sondern daß alles, was in nächster Nähe eine ähnliche Richtung aufweist, zusammengefaßt wird. Dies schließen wir daraus, daß in sehr jungen Stadien die beiden Primärwände durch Maceration noch leicht getrennt werden können, während nach der Differenzierung der Schließhaut und des Torus die Zellen im Gebiete der Hoftüpfel viel besser aneinander haften.

Bildung des Randwulstes

Der Randwulst oder Margo des Hoftüpfels wird bei den sekundären Tracheiden schon vor den Differenzierungserscheinungen in der Primärwand der zukünftigen Tüpfelkammer angelegt. Wie Fig. 6 zeigt, ist rings um die Tüpfelanlage die paralleltexturierte Wand bereits sichtbar, und der Tüpfelrand zeichnet sich durch größere Dicke aus, so daß er nur mangelhaft durchstrahlt werden kann. Das Tüpfelfeld, das in Fig. 6 etwa 10 μ und in Fig. 3 etwa 12 μ Durchmesser aufweist, wird nun von der Seite her überwachsen, indem sich der Randwulst wie eine Irisblende schließt (Fig. 8), bis der Porus eine Öffnung erreicht hat, wie er für die ausgewachsenen Hoftüpfel der sekundären *Pinus*-Tracheiden charakteristisch ist. Während der Margo durch circular angelegte Fibrillen zentripetal wächst, geht das Dickenwachstum der Sekundärwand weiter. Wie Bailey u. Vestal (1937) festgestellt haben, werden dann die später aufgelagerten Fibrillen nicht mehr streng tangential angeordnet, sondern sie werden in der schiefen Richtung der Schraubentextur der Sekundärwand angelegt und umfließen gleichsam beidseitig den Porus.

Abb. 1. Fig. 1—4 *Pinus silvestris* L. (Macerationsmethode). Fig. 1: Spitze einer primären Tracheide nach Abschluß des Spitzenwachstums. Die weniger deutlich abgebildeten Hoftüpfelanlagen liegen auf der hinteren Wand der kollabierten Zelle. Fig. 2: Erste Anlage einer Schließhaut durch Zusammenfassung verschiedener Mikrofibrillen zu Strängen im Gebiet, wo das Flächenwachstum abgeschlossen ist. Fig. 3: Zusammenraffung der Mikrofibrillen zu radial verlaufenden Haltesträngen. Tangential verlaufende Mikrofibrillen werden von der Umorientierung nicht erfaßt. Fig. 4: Rand einer Fenstertüpfel-Schließhaut mit ringförmig aufgelagertem zusätzlichem Primärnetzwerk. Fig. 5. *Abies alba* Miller (Feinschnittmethode). Ausdifferenzierte Schließhaut mit zusammengerafften Radialsträngen und unverbänderten Tangentialfibrillen. Circulartextur des Torus sichtbar

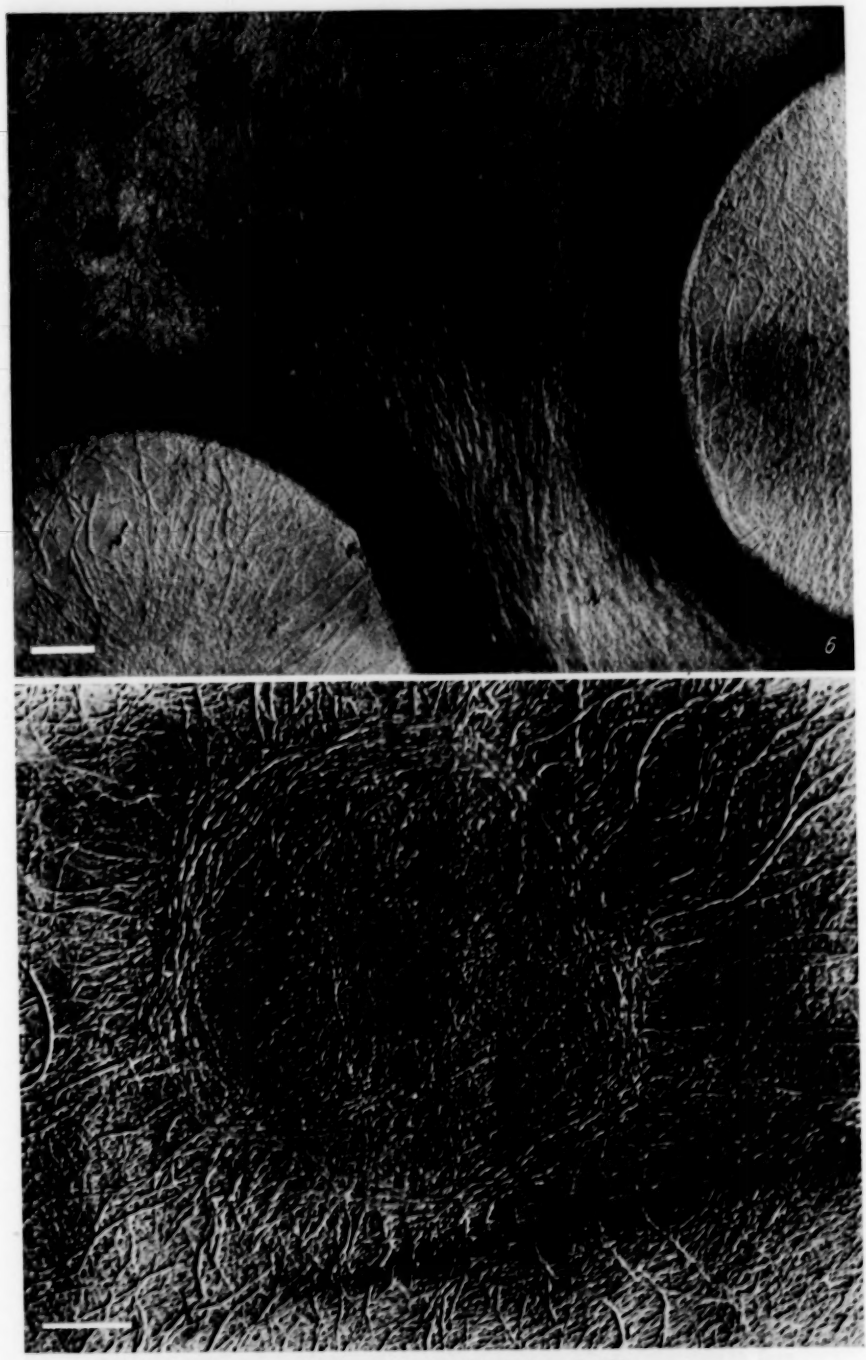

Abb. 2. Fig. 6 und 7. (Legende s. S. 121)

KERR u. BAILEY nennen die Wandschicht, deren irisartiges Randwachstum soeben beschrieben worden ist, die Außenschicht der Sekundärwand; nach der Terminologie von MEIER (1955) kann man sie dagegen auch als Übergangsschicht bezeichnen, denn sie leitet tatsächlich zur definitiven Schraubentextur der mächtigen Sekundärwand über.

Bildung der Fenstertüpfel

Wie Fig. 4 zeigt, werden die Fenstertüpfel, die bei *Pinus* im Kontakte mit den Markstrahl-Speicherzellen entstehen, ähnlich wie die Hoftüpfel angelegt, nur ist ihr Randwulst weniger deutlich ausgeprägt. Auch weist dieser kein Randwachstum auf, denn die Tüpfelfelder von 20 und mehr μ Weite bleiben offen. Interessant ist, daß die Schließhaut, die keinerlei besondere Differenzierungen aufweist, dichter gewoben erscheint (Fig. 4) als jene der noch undifferenzierten Hoftüpfel. Dieses dicht geschlagene Geflecht kommt wahrscheinlich so zustande, daß mehrere gewobene Primärwandlamellen übereinandergelegt werden. Auf Fig. 4 erkennt man, wie an den dunklen Rand der Sekundärwand ein zusätzlicher Primärwandring auf die Schließhaut gelegt worden ist. Ob dies nur eine Randverstärkung der riesigen Schließhaut vorstellt, oder ob diese Lamelle zentripetal weiter wächst, bis die ganze Tüpfelhaut damit überzogen ist, läßt sich nicht entscheiden. Wir haben eine solche durch eine zusätzliche Primärwandlage verstärkte Randzone der Schließhaut in zahlreichen Präparaten gefunden; doch läßt sich bei den macerierten Zellen nie mit Sicherheit feststellen, inwieweit sie fertig ausdifferenziert sind oder ob sie bei der Fixation noch im Wachstum begriffen waren.

Diskussion

Die Untersuchung hat zwei neue Gesichtspunkte gezeitigt:

Wie bei der Anlegung des Torus und bei der Verstärkung der Fenstertüpfel-Schließhaut beobachtet worden ist, kann die Primärwand durch Überlagerung mit zusätzlichen gewobenen Primärhautlamellen verdickt werden. Dies ist offenbar dasselbe Phänomen, das ROELOFSEN (1951) bei den als Multinetz-Wachstum bezeichneten Vorgängen des Spitzenwachstums (HOUWINK u. ROELOFSEN 1954) beschrieben hat: Neue Primärwandgeflechte werden auf die aufgelockerten Stellen des lokalen Flächenwachstums gelegt. Bei den von uns beobachteten Fällen steht diese Auflagerung nicht im Dienste des Flächenwachstums, sondern sie führt zu einer Verdickung und damit zu einer Verfestigung der Primärwand. Es können daher in dieser Wand mehrere gewobene Lamellen

Abb. 2. *Pinus silvestris* L. (Macerationsmethode). Fig. 6: Zwei benachbarte Hoftüpfelanlagen, von denen die eine die Differenzierung der Haltefäden noch nicht, die andere dagegen deutlich eingeleitet hat. Fig. 7: Anlage des Torus, darunter die hintere Primärwand der Zelle

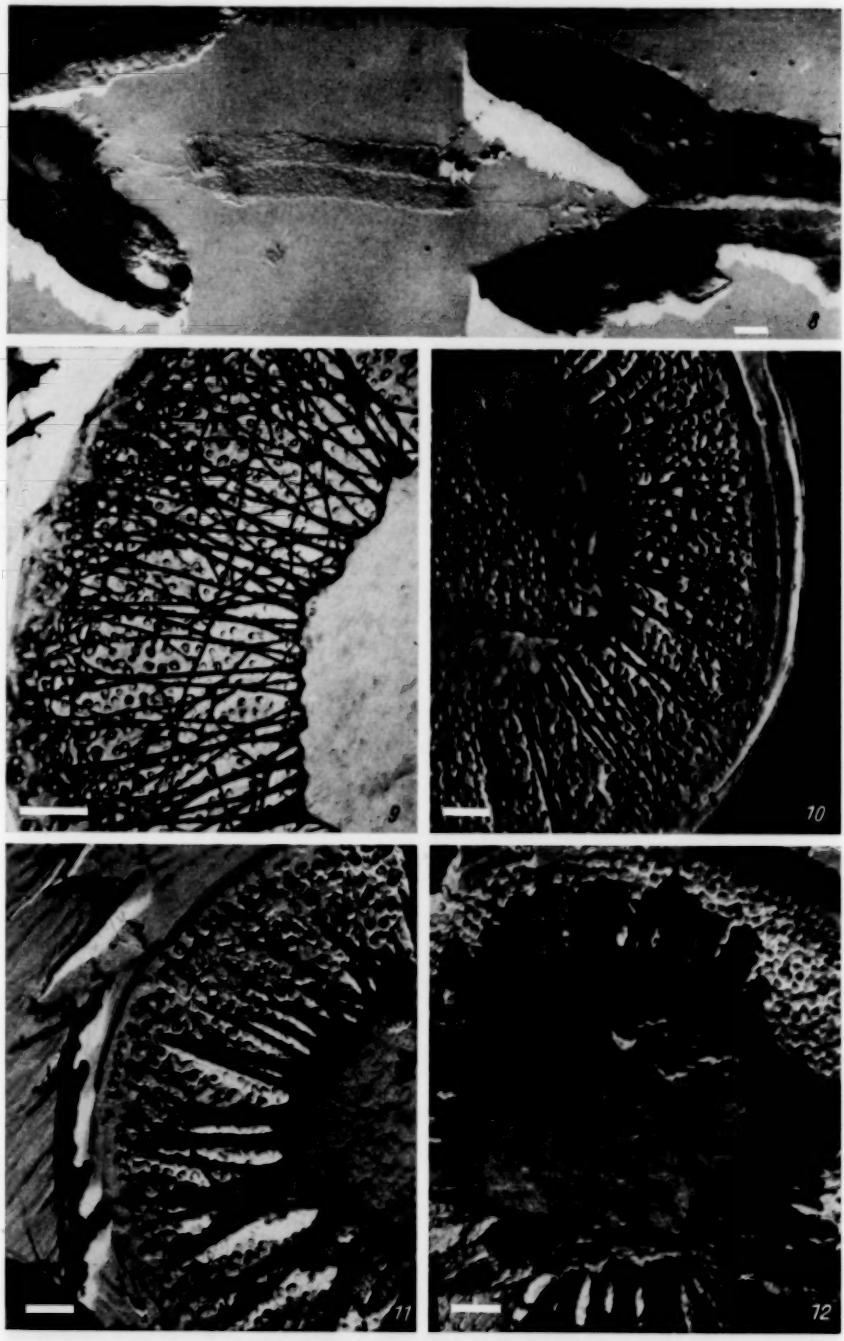

Abb. 3. Fig. 8—12. (Legende s. S. 123)

übereinanderliegen. Nur so ist es verständlich, daß die riesigen Schließhautflächen der Fenstertüpfel ohne Verstärkungsleisten genügend Festigkeit erlangen, um ihren Dienst zu versehen.

Eine zweite, wohl noch wichtigere Feststellung ist die Beobachtung der nachträglichen Verschiebung und Raffung von in der Streuungstextur der Hoftüpfel-Schließhaut bereits niedergelegten Mikrofibrillen (Fig. 2 und 3). Das Auseinanderdrängen von Mikrofibrillen ist zwar auch beim sogenannten Mosaikwachstum (Frey-Wyssling u. Stecher 1951) beschrieben worden. Aber dort werden die Mikrofibrillen unter Flächenerweiterung blasig auseinandergetrieben, während hier die Auflockerung durch eine Parallelisierung und Zusammenlegung streuender Mikrofibrillen zustande kommt. Die Verbänderung der aus der Primärwand in die Schließhaut streichenden Mikrofibrillen kann man auch in einfachen Tüpfeln beobachten (Mühlethaler 1950a, Fig. 8). Die vorliegende Studie zeigt damit, daß bei der Differenzierung der Tüpfelschließhaut stets gewisse Mikrofibrillen zu derben Strängen zusammengefaßt werden.

Die große Frage ist nun, wie die beobachteten Mikrofibrillen-Verschiebungen zustande kommen. Es besteht kein Zweifel, daß hier das wandbildende Cytoplasma aktiv eingreifen muß. Beim Mosaikwachstum werden die Mikrofibrillen immer blasig auseinandergetrieben. Man kann sich daher vorstellen, daß das zwischenfibrillare Cytoplasma örtlich wächst oder aufquillt. Wenn die Fibrillen beseitigt sind und die Mittellamelle aufgelöst wird, wären auch verbindende Plasmastränge nach Art der Plasmodesmen zwischen den benachbarten Zellen denkbar. Dies muß namentlich bei der Tüpfelbildung in Betracht gezogen werden (Wardrop 1954), da ja höchst selten einseitige Tüpfel entstehen, so daß sie also in der Regel von zwei benachbarten Protoplasten aufgebaut werden. Trotzdem ist kaum anzunehmen, daß die beiden Nachbarn miteinander fusionieren. Vielmehr stellen wir uns vor, daß gleich wie die Mikrofibrillenbildung durch die Oberflächenschichten der beiden Protoplasten zwar koordiniert, jedoch unabhängig voneinander geschieht, auch jede Zelle ihr Primärwandgeflecht selbständig auszuweiten und umzubauen vermag. Für die Ausweitung müssen die Mikrofibrillen auseinander, für die Bildung der Schließhautstränge dagegen zusammengeschoben werden. Ferner muß man annehmen, daß dort, wo die Primärwand nicht von der Sekundärwand überdeckt werden

Abb. 3. *Abies alba*. Fig. 8: Feinschnittmethode, Fig. 9—12: Kohleabdruckmethode. Fig. 8: Längsschnitt. Zeigt Doppelnatur des Torus und im zentripetalen Wachstum begriffene Margines. Fig. 9: Hoftüpfel aus dem 5.—6. Jahrring. Unter der Schließhaut sind die für die Margo-Innenwand charakteristischen Warzen der Tertiärwand sichtbar. Fig. 10: Hoftüpfel aus dem 7.—8. Jahrring. Fig. 11: Hoftüpfel aus dem 14.—15. Jahrring (verkrustet). Fig. 12: Hoftüpfel aus dem 17.—18. Jahrring (stark verkrustet). — Die Länge des weißen Striches auf den Figuren entspricht 1 μ.

soll, also in den Tüpfelfeldern, ein besonderer Cytoplasmapfropfen die zukünftige Schließhaut abdecken muß. Hier produziert das Plasma keine Sekundärwandfibrillen, sondern es gestaltet die vorhandene Primärwand zur Schließhaut um. Man darf sich auch vorstellen, daß bei den Hoftüpfeln dieses Plasma befähigt ist, den Margo über der Schließhaut und dem Torus aufzubauen und hier den Kontakt zwischen Primär- und Sekundärwand zu verhindern.

Nachdem die Entwicklung der Hoftüpfel abgeklärt ist, steht fest, daß bei der Differenzierung der Schließhaut Reste der ursprünglichen Primärwandtextur persistieren (Fig. 5). Sie bleiben bis sechs Jahre lang erhalten (Fig. 9, 10), sind also im wasserleitenden Splint sicher vorhanden. Später verschwinden sie freilich, und die Haltefäden werden durch Mineralisation zusehends dicker und spröder (Fig. 11, 12). Die Bilder 9 und 10 sind mit dem Kohleabdruckverfahren (Mühlethaler 1955) gewonnen worden, so daß es also auch auf Abdrucken gelingt, die feineren Querverbindungen der Haltefäden abzubilden.

Die Kontroverse über den Feinbau der Hoftüpfel-Schließhaut kann dahin präzisiert werden, daß neben den Haltefäden, die ja mikroskopische Dicken erreichen (Russow, Bailey), die feineren Querspangen erhalten bleiben können, so daß ein grobes Netz vorhanden ist (Fig. 5, 9, 10). Die feinere Netztextur, die wir 1953 gefunden haben, ist nur in sehr jungen Schließhäuten, die ihre Differenzierung noch nicht abgeschlossen haben, anzutreffen.

Die Poren des Netzes sind von der Größenordnung 0,3 μ (Fig. 9). Es ist also verständlich, daß Gold- und Rußteilchen von 150 mμ Durchmesser durch die Schließhaut filtriert werden (Frenzel 1929, Liese u. Johann 1954b). Andererseits erzeugen die Querspangen zwischen den Haltefäden (Fig. 5, 9, 10) eine wesentliche Bremsung der Wasserfiltration, verglichen mit den völlig offenen Spalten, die Liese und Mitarbeiter (1953, 1954) abbilden. Im letzteren Falle hätten die Poren die Dimensionen von der Größenordnung $0{,}3\,\mu \times 3\,\mu = 0{,}9\,\mu^2$; aus Fig. 9 ergibt sich jedoch z. B. $(0{,}3\,\mu)^2 = 0{,}09\,\mu^2$, jedenfalls also ein wesentlich kleinerer Wert. Dies ist einer der Gründe, warum die Strömungsgeschwindigkeit des Transpirationswassers in den Tracheiden des Koniferenholzes etwa 10mal kleiner ist als in den Gefäßen der Laubhölzer mit ihren offenen Durchbrechungen.

Summary

1. The pit membrane of bordered pits develops from the original primary cell wall which shows a homogeneous dispersed texture of microfibrils (Fig. 1).

2. The radial strands which fix the torus are formed by joining together existing microfibrils (Fig. 1, 2, 3, 6), possibly also by adding

new radial microfibrils. Tangentially running microfibrils are not involved in this orientation movement; as a result of this differentiation submicroscopic cross bars link the radial strands of almost microscopic diameter (Fig. 5). The cross bars are not permanent; but they can be preserved even in the 6th to 8th annual ring (Fig. 9, 10).

3. The centre of the pit membrane, where the future torus will be formed, is stiffened by multi-net deposition; afterwards the torus is set up by circular microfibrils with parallel texture (Fig. 7).

4. The border grows by centripetal apposition of tangentially orientated secondary microfibrils to the thickened marginal edge of the secondary wall surrounding the pit field (Fig. 6, 8).

5. The membrane of large half bordered pits between ray parenchyma and tracheids in *Pinus* (in German „Fenstertüpfel") displays the dispersed texture of the primary wall; but it is reinforced by the deposition of additional lamellae, so that a much denser texture results. The strengthening starts with a marginal ring which grows centripetally over the existing membrane like a closing iris diaphragm (Fig. 4).

6. The membrane of ageing bordered pits shows an incrusted aspect by possible mineralization (Fig. 11, 12).

Literatur

Bailey, I. W.: The preservative treatment of wood. II. The structure of the pit membranes in the tracheids of conifers and their relation to the penetration of gases, liquids, and finely divided solids into green and seasoned wood. Forestry Quart. **11**, 12 (1913). — Bailey, I. W., and M. R. Vestal: The orientation of cellulose in the secondary wall of tracheary cells. J. Arnold Arboretum **18**, 185 (1937). — Eicke, R.: Beitrag zur Frage des Hoftüpfelbaues der Koniferen. Ber. dtsch. bot. Ges. **67**, 213 (1954). — Esau, K.: Plant Anatomy, S. 42. New York 1953. — Frenzel, P.: Über die Porengrößen einiger pflanzlicher Zellmembranen. Planta (Berl.) **8**, 642 (1929). — Frey-Wyssling, A., u. H. H. Bosshard: Über den Feinbau der Schließhäute in Hoftüpfeln. Holz (Berlin) **11**, 417 (1953). — Frey-Wyssling, A., K. Mühlethaler und H. H. Bosshard: Das Elektronenmikroskop im Dienste der Bestimmung von *Pinus*arten. Holz (Berlin) **13**, 245 (1955). — Frey-Wyssling, A., u. H. Stecher: Das Flächenwachstum der pflanzlichen Zellwände. Experientia (Basel) **7**, 420 (1951). — Harada, H., and Y. Miyazaki: The electron microscopic observation of the cell wall of conifer tracheids. J. Jap. Forestry Soc. **34**, 350 (1952). — Houwink, A. L., u. P. A. Roelofsen: Fibrillar architecture of growing plant cell walls. Acta bot. neerl. **3**, 385 (1954). — Kerr, Th., and I. W. Bailey: Structure, optical properties and chemical composition of the so-called middle lamella. J. Arnold Arboretum **15**, 327 (1934). — Liese, W., u. M. Fahnenbrock: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Bau der Hoftüpfel. Holz (Berlin) **10**, 197 (1952). — Liese, W., u. M. Hartmann-Fahnenbrock: Elektronenmikroskopische Untersuchungen über die Hoftüpfel der Nadelhölzer. Biochim. et biophysica Acta **11**, 190 (1953). — Liese, W., u. I. Johann: Elektronenmikroskopische Beobachtungen über eine besondere Feinstruktur der verholzten Zellwand bei einigen Coniferen. Planta (Berl.) **44**,

269 (1954a). — Experimentelle Untersuchungen über die Feinstruktur der Hoftüpfel bei den Koniferen. Naturwiss. **41**, 579 (1954b). — Meier, H.: Über den Zellwandabbau durch Holzvermorschungspilze und die submikroskopische Struktur von Fichtentracheiden und Birkenholzfasern. Diss. E. T. H. Zürich 1955. Holz (Berlin) **13**, 323 (1955). — Mühlethaler, K.: Electron microscopy of developing plant cell walls. Biochim. et biophysica Acta **5**, 1 (1950a). — Elektronenmikroskopische Untersuchungen über den Feinbau und das Wachstum der Zellmembranen in Mais- und Haferkoleoptilen. Ber. schweiz. bot. Ges. **60**, 614 (1950b). Die Struktur einiger Pollenmembranen. Planta (Berl.) **46**, 1 (1955). — Roelofsen, P. A.: Orientation of cellulose fibrils in the cell wall of growing cotton hairs. Biochim. et biophysica Acta **7**, 43 (1951). — Russow, E.: Zur Kenntnis des Holzes, insonderheit des Coniferenholzes. Bot. Zbl. **13**, 171 (1883). — Wardrop, A. B.: The mechanism of surface growth in the differentiation of fibres and tracheids. Austral. J. Bot. **2**, 165 (1954).

Prof. Dr. A. Frey-Wyssling, Zürich (Schweiz),
Institut für Allgemeine Botanik der Eidgenössischen Technischen Hochschule

Planta, Bd. 47, S. 127—158 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Universität Tübingen

DIE ABHÄNGIGKEIT DES PROTONEMAWACHSTUMS UND DER PROTONEMAPOLARITÄT BEI FARNEN VOM LICHT

Von

HANS MOHR

Mit 36 Textabbildungen

(Eingegangen am 3. Januar 1956)

1. Einleitung

Im Zusammenhang mit Untersuchungen über die Beeinflussung der Farnsporenkeimung durch Licht verschiedener Wellenlängen (MOHR 1956) wurde auch das Wachstum der Farnprotonemen unter verschiedenen Lichtqualitäten untersucht. Dabei hat sich gezeigt, daß nicht nur das Längenwachstum, sondern daß auch die polare Struktur der Farnprotonemen in charakteristischer Weise von den Lichtverhältnissen abhängt. Es hat sich erwiesen, daß Längenwachstum und Polarität im Protonema so eng zusammenhängende Phänomene sind, daß sie gemeinsam untersucht und behandelt werden müssen.

KLEBS (1917), STEPHAN (1928) und ORTH (1937) haben für das Protonemenwachstum übereinstimmend eine antagonistische Wirkung kurz- und längerwelliger Strahlen festgestellt, was ich, um dies vorwegzunehmen, voll bestätigen kann.

Qualitativ hat schon KLEBS die wesentlichsten Zusammenhänge richtig erkannt. Während im blauen Licht das Längenwachstum der Protonemen gehemmt ist und sich kurze, mehrzellige Prothallien bilden, übt das längerwellige sichtbare Licht eine fördernde Wirkung auf das Längenwachstum der Protonemen aus, so daß lange Keimfäden entstehen. Über die Wirkung der infraroten Strahlung (in der Bedeutung von $\lambda > 760$ mμ!) stimmen die Angaben der genannten Autoren nicht überein. Während KLEBS keinen erheblichen Einfluß dieser Strahlung nachweisen konnte, stellte ORTH eine Hemmwirkung des Infrarots um 1000 mμ auf die Protonemen fest.

Der Polarität der Protonemen und ihrer Beeinflussung durch das monochromatische Licht haben die erwähnten Autoren keine Beachtung geschenkt. Meine Aufgabe war nun, das Aktionsspektrum des Protonemenwachstums und der Polaritätsbeeinflussung mit Hilfe schmaler Spektralbereiche genauer zu untersuchen und mit dem Aktionsspektrum der Farnsporenkeimung zu vergleichen.

2. Methodik

Ein Teil der Methodik der vorliegenden Arbeit wurde bereits in der Arbeit über Farnsporenkeimung besprochen (vgl. MOHR 1956).

a) Das Ausgangsmaterial. Zur Gewinnung eines möglichst homogenen Ausgangsmaterials wurden die Sporen wie bei den Keimversuchen ausgesät, jedoch weniger dicht. Das Schälchen wird dann mit einem Glasdeckel versehen, mit Wollfett abgedichtet und 4 Tage mit Fluorescenzlicht im Lichtfeld bei etwa 650 Lux belichtet (20° C). Anschließend wird das Schälchen 2 Tage ins Dunkle gebracht. Nach 6 Tagen sind praktisch alle keimfähigen Sporen gekeimt, aber nicht ausgewachsen. Jetzt erst wird Nährlösung hinzugefügt. Dazu wird am Rand des Schälchens aus dem Agar ein Streifen von 5 mm Breite herausgeschnitten, so daß nur noch eine Agarscheibe von 2 cm Durchmesser in der Schale verbleibt, auf der die nun angekeimten Sporen liegen. In den entstandenen Raum werden 0,4 ml Nährlösung gegeben (Abb. 1), die Schale mit einem Filter versehen und für die Wachstumsversuche verwendet.

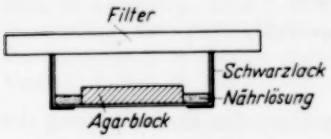

Abb. 1. Schema der Anordnung von Agar, Nährlösung und Filter

Fügte ich die Nährlösung schon bei der Sporenaussaat hinzu, so wurde das Ausgangsmaterial nicht so homogen, da die Protonemenbildung dann schon in zahlreichen Fällen im Dunkeln einsetzte, während manche Sporen noch nicht voll gekeimt waren.

b) Die Nährlösung. Die verwendete Nährlösung hat folgende Zusammensetzung:

0,25 g $MgSO_4$
1,00 g $Ca(NO_3)_2$
0,25 g KH_2PO_4
0,12 g KNO_3
Spur $FeCl_3$
auf 1000 cm^3 Aqua bidest.

Der p_H-Wert der Nährlösung lag bei $5{,}0 \pm 0{,}1$.

c) Die Lichtverhältnisse. Alle Wachstumsversuche wurden im Dauerlicht (weiß oder monochromatisch) vorgenommen.

Neben den früher (MOHR 1956) besprochenen Interferenzfiltern wurden noch SCHOTTsche Farbgläser (Glasfilter) benutzt, und zwar die Filter RG 9 (Langwelliges Rot und nahes Infrarot), RG 2 (Rot), OG 4 (Orangegelb), VG 9 (Gelbgrün), BG 7 (Blau) und BG 3 (Blauviolett). Es ist hier an die kritischen Bemerkungen zu erinnern, die über die Interferenzfilter gemacht wurden. Was die Glasfilter angeht, so wird hier der Fehler, der durch die Art der Energieverteilung im Emissionsspektrum der Glühwendel entsteht, größer. Der langwellige Teil des durchgelassenen Lichtes ist stets relativ stärker vertreten, als die Durchlässigkeitskurven angeben. Dazu kommt noch, daß sich, da aus technischen Gründen nur eine 4,5 cm dicke Wasserschicht vorgeschaltet werden konnte, die mehr oder weniger große Durchlässigkeit der Glasfilter für Infrarot bei der Energiemessung störend auswirkte. Somit bleibt die Einstellung der Glasfilter auf gleiche Energie problematisch. Da aber die Versuche mit Glasfiltern lediglich Ergänzungen zu dem mit Interferenzfiltern gewonnenen Wirkungsspektrum darstellen, stand ihrer Anwendung nichts im Wege. Wenn man z. B. lediglich feststellen will, wie sich eine erhöhte Einstrahlung von Blaulicht auswirkt, so ist Filter BG 7 sehr wohl brauchbar, und eine genaue Messung der durchgelassenen Energie bietet die Möglichkeit, wenigstens näherungsweise eine Beziehung zwischen der Intensität und der beobachteten Wirkung herzustellen.

d) Temperatur, Luftfeuchtigkeit und Luftvolumen. Alle Versuche mit Interferenzfiltern wurden in einer Klimaanlage bei 20° C ausgeführt. Bei den Versuchen mit Glasfiltern waren geringere Temperaturschwankungen nicht zu vermeiden.

Aus räumlichen Gründen konnten diese Versuche nicht in einer Klimaanlage durchgeführt werden, sondern mußten in einer normalen Dunkelkammer vorgenommen werden, deren Temperatur im Bereich von 21 ± 2^0 C gehalten wurde. Besonders infolge der sekundären Wärmestrahlung der belichteten Glasfilter stieg, trotz dauernder Kühlung mit Ventilatoren, die Temperatur im Agar etwas über die Temperatur der Umgebung an. Die größte festgestellte Erhöhung betrug etwa $1{,}5^0$ C (Messung mit Thermonadel).

Aus Vorversuchen ging hervor, daß der Luftfeuchtigkeit eine gewisse Rolle zukommt. Wie Abb. 1 zeigt, wachsen die Protonemen bei hoher relativer Luftfeuchtigkeit heran. Weiterhin war dafür zu sorgen, daß aus den Schälchen kein Wasser verdunstete, da dies zu unkontrollierbaren Veränderungen der Konzentration von Agar und Nährlösung geführt hätte. Durch den luftdichten Verschluß der Schälchen wurde dies erreicht.

Auf Grund von Vorversuchen war die Annahme berechtigt, daß für ein 6tägiges Protonemenwachstum das abgeschlossene Luftvolumen in der Schale ausreicht. Klebs (1917) hat ähnliche Erfahrungen gemacht. Es mußte beachtet werden, daß Interferenzfilter aus technischen Gründen nur in Räumen mit niederer Luftfeuchtigkeit benutzt werden können und daß kein Wasser aus dem Reaktionsgefäß verdunsten darf. Die in Abb. 1 skizzierte Anordnung zeigt einen möglichen Kompromiß. Das abgeschlossene Luftvolumen mußte dabei in Kauf genommen werden.

e) Die Ausmessung der Protonemen. Bei 120facher Vergrößerung (10fache Objektivvergrößerung) betrug die Protonemendichte je Blickfeld 4—8. Da eine sorgfältige Ausmessung der Protonemen sehr langwierig ist, konnten je Versuch nur 30—50 Protonemen gemessen werden, und zwar im Mittel je Blickfeld 1—2 gut ausmeßbare Formen, wobei Kümmerexemplare vermieden wurden. Die Bestimmung der Länge erfolgte mit einem der üblichen Okularmikrometer, die der Breite mit einem sehr genauen Fadenokularmikrometer der Firma Leitz. Da die Protonemen sich oft, z. B. infolge phototropischer Reaktion, vom Substrat abheben, müssen sie für die Längenmessung mit einem leichten Fingerdruck an das Substrat gepreßt werden. Da dabei die Gefahr besteht, daß die Breite etwas verändert wird, so wurde die Breitenmessung von der Längenmessung getrennt und vor dem Anpressen vorgenommen. Es ließ sich also nicht vermeiden, daß für die Messung von Länge und Breite nicht dieselben Individuen benutzt werden konnten. Waren die Protonemen nicht annähernd gleichmäßig breit, so wurde die Breite der 2. Zelle, von der Basis her gesehen, als Protonemenbreite bezeichnet.

Der mittlere Fehler des arithmetischen Mittels der Breite und Länge wurde nach der üblichen Formel:

$$m_{\bar{x}} = \pm \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{n\,(n-1)}}$$

berechnet. Der mittlere Fehler des Quotienten Länge : Breite wurde nach dem Gaussschen Fehlerfortpflanzungsgesetz bestimmt (nach Kohlrausch 1943). Ist $A = f\,(A_1, A_2)$, so ist der mittlere Fehler von A:

$$m_A = \pm \sqrt{\left(m_1 \frac{\partial f}{\partial A_1}\right)^2 + \left(m_2 \frac{\partial f}{\partial A_2}\right)^2}.$$

3. Das Objekt der Untersuchungen

Als Untersuchungsobjekte dienten Protonemen von *Dryopteris filix-mas* (L.) Schott. Von der Farnspore bis zum fertigen Prothallium

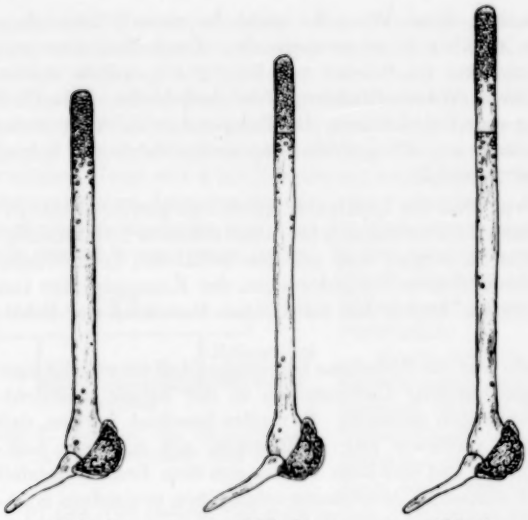

Abb. 2 Abb. 3 Abb. 4

Abb. 2. Einzelliges Chloronema mit Rhizoid (135fach vergr.)
Abb. 3. Junges zweizelliges Chloronema mit Rhizoid (135fach vergr.)
Abb. 4. Älteres zweizelliges Chloronema mit Rhizoid (135fach vergr.)

lassen sich unter normalen Bedingungen drei verschiedene Stadien leicht unterscheiden: 1. Das Stadium der Keimung. 2. Das Stadium des Protonemas, in dem sich ein mehrzelliger Zellfaden bildet. 3. Das Stadium des Prothalliums. Dieses geht aus dem Protonema hervor, wenn dort Zellteilungen einsetzen, die ein flächiges Gebilde entstehen lassen.

Das „Protonema" kann aufgegliedert werden in das nahezu farblose Keimrhizoid und das chloroplastenführende Chloronema. Das Rhizoid wird im Verlauf der Keimung durch eine Zellwand vom Chloronema abgetrennt.

Die nun folgende Beschreibung gilt für Protonemen, die im Dunkeln gewachsen sind. Abb. 2 zeigt das junge einzellige Chloronema. Seine polare Struktur ist deutlich ausgeprägt. Der basale Pol trägt das Keimrhizoid, am apikalen Pol sind nahezu alle

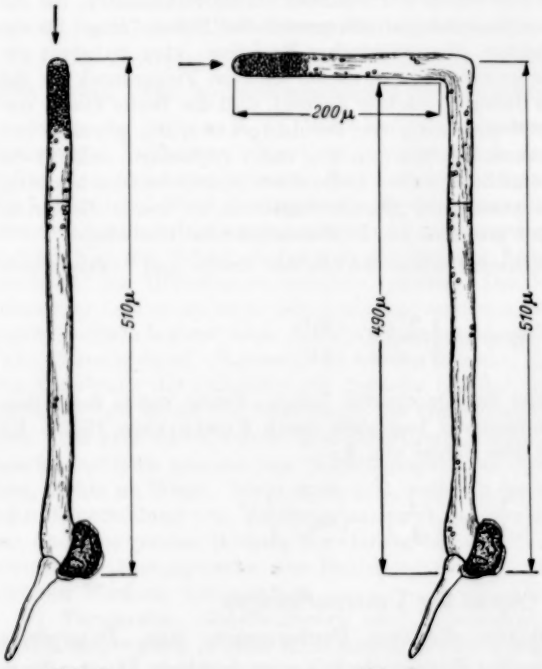

Abb. 5 Abb. 6

Abb. 5. Protonema nach 5 Tagen. (Der Pfeil gibt die Lichtrichtung an. Vergr. 135fach)
Abb. 6. Protonema nach 7 Tagen. (Der Pfeil gibt die Lichtrichtung an. Vergr. 135fach)

im Verlauf der Keimung entstandenen Chloroplasten versammelt. Der übrige Teil des Chloronemas ist durchsichtig und fast frei von Plastiden. Auf den Zusammenhang von Chromatophorenlage und Polarität ist schon öfters hingewiesen worden, z. B. von NIENBURG (1924) und von MÜLLER-STOLL (1952). Auch ist das meiste Plasma der Zelle am apikalen Pol angehäuft, und ebenso ist der Zellkern apikalwärts verlagert.

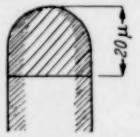

Abb. 7. Die Wachstumszone des Chloronemas (schematisch)

Auf den apikalen Pol ist auch das Wachstum des Chloronemas beschränkt. Dies hängt sicherlich mit der apikalen Plasmaanhäufung zusammen. Relativ einfache Versuche vermitteln eine genauere Kenntnis von der Stelle, an der das Wachstum des Chloronemas, also die Einlagerung von Membransubstanzen, erfolgt. Es muß hier vorausgreifend festgestellt werden, daß das Chloronema schon auf kleine Lichtintensitäten empfindlich phototropisch reagiert und daß die Chloronemen, die bei diesen geringen Weißlichtintensitäten entstehen, sich in ihrem Aufbau nicht wesentlich von den Dunkelformen unterscheiden.

Abb. 8. Verzweigtes Chloronema. Verzweigungen nur am apikalen Ende der Zellen (135fach vergr.)

Diese Umstände gestatten folgende Versuchsanordnungen: Durch einseitige Belichtung wird das Wachstum der Chloronemen, welche positiv phototropisch reagieren, auf die Lichtquelle hin ausgerichtet. Nach 5 Tagen werden einige markierte Protonemen schnell aber genau ausgemessen, dann die Schale um 90° gedreht und weiterhin in derselben Weise seitlich beleuchtet. Nach weiteren 2 Tagen werden die markierten Protonemen erneut ausgemessen und mit den erstgewonnenen Ergebnissen ein Vergleich angestellt. In Abb. 5 und 6 ist ein typischer Fall aufgezeichnet. Der Pfeil gibt die jeweilige Lichtrichtung an. Der Vergleich zeigt, daß als Ort des Längenwachstums des Chloronemas nur ein schmaler Bereich am apikalen Pol der Zelle in Frage kommt (Abb. 7).

Apikale Plasmaanhäufung, apikale Plastidenansammlung, apikale Wachstumszone, basales Rhizoid dürften für die Charakterisierung der Polarität des Chloronemas ausreichend sein.

Wenn es im Chloronema zu einer Zellteilung kommt, so steht die neugebildete Zellwand senkrecht auf der Längsachse des Chloronemas. Den Bereich der Wandbildung gibt Abb. 3 an. Die Zellteilung ist typisch inäqual. Es trennt sich eine plasmareiche, plastidenführende, wachstumsfähige Zelle von einer plasma- und plastidenarmen, nicht mehr wachstumsfähigen Zelle. Abb. 4 zeigt ein älteres zweizelliges Chloronema. Es sei hier eine Apikalzelle von einer Basalzelle unterschieden. (Wird das Chloronema dreizellig, so kann man die mittlere Zelle „Binnenzelle" nennen.) Die Basalzelle erscheint auch noch polarisiert, was verständlich ist, da sie ja von einer polarisierten Zelle abstammt. Den Beweis für die Polarität von Binnen-

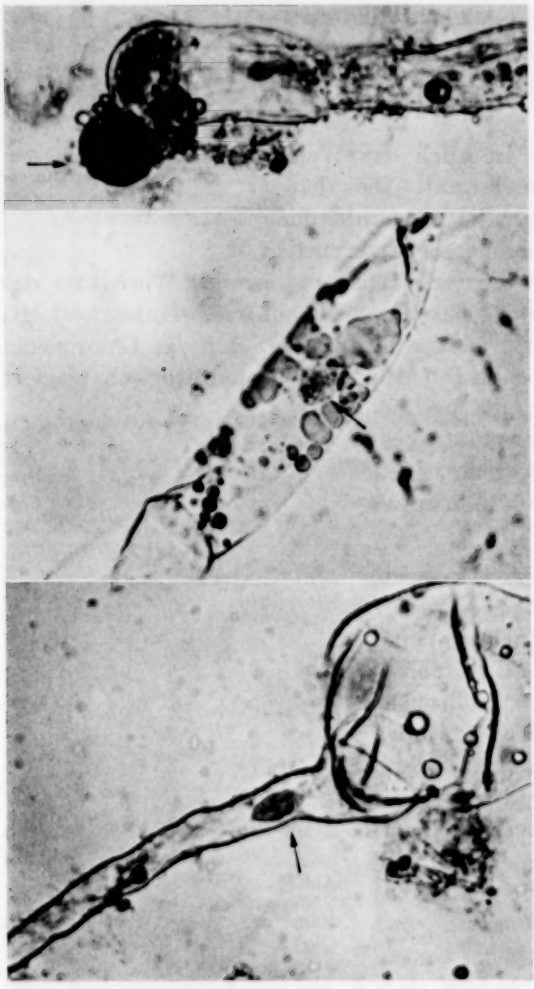

Abb. 9. Kern der Apikalzelle (Karmin-Essigsäure. 585fach vergr.)

Abb. 10. Kern der Basalzelle (Karmin-Essigsäure. 585fach vergr.)

Abb. 11. Kern der Rhizoidzelle (Karmin-Essigsäure. 585fach vergr.)

und Basalzellen liefert folgende Beobachtung: Wenn es, wie es unter bestimmten Bedingungen geschehen kann, zu einer Verzweigung des Chloronemas kommt, so bilden sich die Chloronemenverzweigungen stets am apikalen Pol der Chloronemazellen (Abb. 8). Die Stelle der Auszweigung kündigt sich durch eine Plasmaanhäufung an. Neue Rhizoide bilden sich mehr am basalen Ende. Während sich seitliche Chloronemen nur in unmittelbarer Nähe des apikalen Pols bilden

können, ist der Bereich, in dem neue Rhizoide entstehen, größer. Der Schwerpunkt der Bildung sekundärer Rhizoide liegt aber im Bereich des basalen Pols der Zellen, unmittelbar am apikalen Pol wurde niemals eine Rhizoidbildung beobachtet. Über ähnliche Befunde an Moosprotonemen berichtet v. Wettstein (1953).

Man kann in diesen mehrzelligen Stadien eine Polarität des Chloronemas von einer Polarität der einzelnen Chloronemazelle unterscheiden, ähnlich, wie es Czaja (1930) für *Chladophora*-Fäden getan hat. Die Polarität der Einzelzelle erscheint jedoch in die Polarität des Chloronemas eingefügt. Der Polarität der Apikalzelle, die besonders stark ausgeprägt ist, kommt für Wachstum und Struktur des Fadens eine besondere Bedeutung zu. Nur solange die Apikalzelle wächst, kann im Chloronema eine Polarität nachgewiesen werden (vgl. Reuter 1953).

Auch hinsichtlich der Gestalt und Größe der Kerne ergibt sich eine gleitende Reihe von der Spitze des Chloronemas bis zum Rhizoid (Abb. 9—11). Der Kern der Apikalzelle ist rund und verhältnismäßig groß (Abb. 9). Zum Photographieren wurde der Kern durch einen leichten Druck am apikalen Ende der Zelle ausgepreßt, da die Plastiden, von denen er in seiner natürlichen Lage umgeben ist, die Aufnahme gestört hätten. Der Kern der Basalzelle ist oval und kleiner als der apikale Kern (Abb. 10). Der Kern der Rhizoidzelle (Abb. 11) ist spindelförmig. Dieser Gestaltwandel der Kerne spricht für polar abgestufte Funktionsleistungen der Kerne.

Bopp (1955) hat für *Funaria*-Caulonemen ganz entsprechende Veränderungen der Kernformen beschrieben. Aus der weiteren Beschreibung von Bopp geht hervor, daß in den Caulonemen polare Verhältnisse herrschen, die den hier für Farnchloronemen dargestellten ähnlich sind.

Über die Abwandlungen, die eintreten, wenn man die Protonemen im monochromatischen Licht statt im Dunkeln wachsen läßt, soll nach einem kurzen Überblick über die Problematik der Polarität berichtet werden.

4. Das Polaritätsproblem

Die große Bedeutung der Zellpolarität für das Entwicklungsgeschehen der Lebewesen ist heute allgemein erkannt. In jüngster Zeit haben z. B. Bünning (1953), Seidel (1953) und Kühn (1955) das Problem eingehend diskutiert. Wesentliche Fragen stehen gegenwärtig noch offen. Als besonders wichtig können zwei Fragen herausgestellt werden: 1. Wie kommt in einer Zelle eine polare Struktur zustande? 2. Wie bleibt diese polare Struktur der Zelle erhalten?

Über die Induktion einer Zellpolarität ist öfters berichtet worden (s. Zusammenfassung von Bloch 1943). Zahlreiche Außenbedingungen sind in der Lage, eine

polare Struktur in der noch unpolarisierten Zelle zu induzieren. Eine besonders wichtige Rolle fällt dabei dem Licht zu.

Innerhalb polarisierter Zellen konnten stoffliche Gefälle nachgewiesen werden, z. B. von HÄMMERLING (1934). Diese Gradienten äußern sich auch noch anderweitig, etwa in einem Potentialgefälle oder in einem Gefälle des p_H-Wertes.

BÜNNING (1953) weist darauf hin, daß das Gesamtphänomen der Polarität nicht mit diesen stofflichen Gradienten identifiziert werden darf, da die Frage offenbleibt, wie solche Gradienten aufrecht erhalten werden. Er nimmt deshalb eine „stabile, strukturelle Polarität" an, die ihrerseits die stofflichen Gefälle erklären soll. Er kommt weiter zu dem Schluß, daß die Polarität „an die mehr starren, peripheren Schichten des Protoplasmas" gebunden sei.

Damit ist ein statisches Bild der Polarität entworfen: Die polare Differenzierung der Zelle ist an eine plasmatische Asymmetrie gebunden, die in den äußersten Plasmaschichten ihren Sitz hat. Danach ist eine Zerstörung dieser Polarität nur möglich, wenn ein Eingriff in die plasmatische Struktur vorgenommen wird, wie es z. B. mit Colchicin möglich ist.

In meinen Versuchen wurde der Einfluß des sichtbaren Lichtes und des nahen Infrarot auf die Zellpolarität untersucht. Durch die Verwendung dieser Wellenlängen wurde die Möglichkeit einer direkten Beeinflussung des Eiweißes ausgeschaltet, da Licht dieser Wellenlängen von den Proteinen nicht absorbiert wird.

Wenn sich nun zeigen läßt, daß die Zellpolarität durch die angewendeten Lichtqualitäten verändert oder gar aufgehoben werden kann, so gibt es zwei Möglichkeiten: 1. Durch Vermittlung sensibilisatorischer Pigmente kann die eingestrahlte Energie sich doch auf das Eiweißgerüst auswirken. 2. Man muß damit rechnen — wie es auch schon ältere Autoren vermutet haben —, daß in manchen polarisierten Zellen nur eine labile „Gefällepolarität" vorhanden ist, die nicht auf der Struktur bestimmter Plasmaschichten beruht.

5. Versuche mit Interferenzfiltern

Eben gekeimte Sporen (vgl. Abschnitt 2a) wurden in monochromatisches Licht gebracht und nach 6 Tagen Länge, Breite und Zellzahl der Chloronemen bestimmt. Das monochromatische Licht der Interferenzfilter war intensitätsgleich (Intensität: 200 erg/cm²sec).

Bei diesen Versuchen erwies sich bereits ein fester Zusammenhang zwischen der polaren Differenzierung des Chloronemas und seinem Längenwachstum. Ist das Längenwachstum eingeschränkt, so ist auch die Polarität, z. B. erkennbar an der Verteilung von Plasma und Plastiden, nicht mehr so streng wie in den Fällen, wo das Längenwachstum gefördert ist.

In Abb. 12 ist der Quotient mittlere Chloronemalänge durch mittlere Chloronemabreite (= L/B) als Funktion der Wellenlänge dargestellt.

Durch die Benutzung dieses Quotienten an Stelle der Länge sollen Fehler durch einen Einfluß der in den verschiedenen Spektralbereichen verschiedenen Assimilationsleistung möglichst vermieden werden. Eine hohe Assimilationsleistung und eine hohe Stoffproduktion werden sich vermutlich in einem vermehrten Längen- *und* Breitenwachstum ausdrücken, so daß L/B ein günstigeres Maß ist als die Länge allein, wenn es gilt, die Tendenz zum Längenwachstum in Abhängigkeit von der Wellenlänge aufzutragen.

Nach Abb. 12 tritt im Blaulicht eine starke Hemmung des Längenwachstums ein, dagegen im Bereich zwischen 520 und 760 mμ eine Förderung des Längenwachstums gegenüber der Dunkelform. Der geprüfte Infrarotbereich (760–1100 mμ) scheint ziemlich wirkungslos zu sein. Die stärkste Förderung des Längenwachstums findet im grüngelben und im langwelligroten Spektralbereich statt, während im Rotlicht die Förderung etwas weniger stark ist.

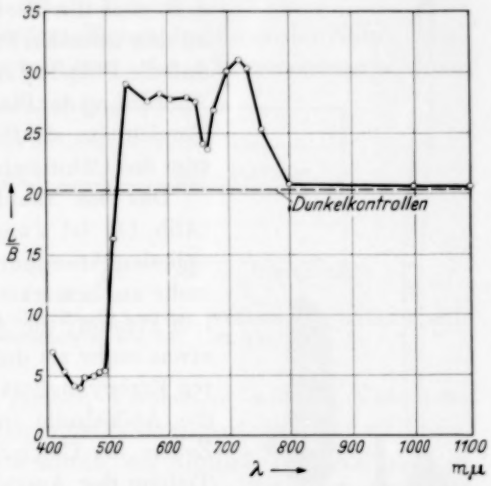

Abb. 12. Mittlere Länge durch mittlere Breite der Chloronemen in Abhängigkeit von der Wellenlänge (nach 6 Tagen Kultur bei einer Intensität von 200 erg/cm²sec). Mittlere Fehler: 410—495 mμ 0,1—0,2; 510—754 mμ 0,5—0,8; 801—1100 mμ und Dunkelkontrolle 0,7—0,8

Grundsätzlich stimmt das hier vorgelegte Aktionsspektrum mit den Angaben von KLEBS, STEPHAN und ORTH überein. Ein genauer Vergleich soll nicht vorgenommen werden, da die erwähnten Forscher mit relativ breiten Spektralbereichen gearbeitet haben und die Länge der Protonemen (nicht L/B) beobachtet haben. Erwähnt sei lediglich, daß STEPHAN und ORTH ebenfalls im gelben Spektralbereich ein Maximum des Längenwachstums gefunden haben. Für den Infrarotbereich über 760 mμ werden die Befunde von KLEBS bestätigt: Es kann kein erheblicher Effekt dieser Strahlung auf das Protonemenwachstum nachgewiesen werden. Die aktive Hemmung, die ORTH für diesen Bereich angibt, wurde nicht gefunden.

Die starke Hemmwirkung des langwelligen Rotlichtes und des nahen Infrarot auf die Sporenkeimung wiederholt sich also beim Protonemenwachstum nicht. Ein entsprechendes Phänomen bei Samen hat schon RESÜHR (1939) festgestellt. Er fand — zu seiner Überraschung —, daß das langwellige Rot die Samenkeimung zwar sehr stark hemmt, auf das Wachstum der Radicula aber keinerlei hemmenden Einfluß ausübt.

Die Vermutung liegt nahe, daß der Fördereffekt des längerwelligen Lichtes letztlich eine Folge der Photosynthese ist. Nach URSPRUNG (1918) liegt die Grenze der Stärkebildung gegen das Langwellige hin im gleichen Bereich, wo auch die Förderung des Längenwachstums der

Protonemen aufhört. Es ist bekannt, daß auch das Absorptionsspektrum des Chlorophylls in diesem Bereich endet.

Abb. 13 und 14 geben einen Eindruck von einer Rotform (Filter 649) und einer Blauform (Filter 445). Die Rotform stimmt, wie alle Formen zwischen 530 und 1100 mμ, in ihrem Aufbau prinzipiell mit der Dunkelform überein. Jedoch ist das Längenwachstum erheblich gesteigert, und die Polarität des Chloronemas ist noch deutlicher ausgeprägt, z. B. sind die Plastiden und die Kerne noch enger an den apikalen Pol gelagert. Es hat sich gezeigt, daß die Polarität im Chloronema, gemessen an der Anordnung der Plastiden in der Apikalzelle, in dem Bereich am straffsten ist, wo das Längenwachstum des Chloronemas am meisten gefördert wird.

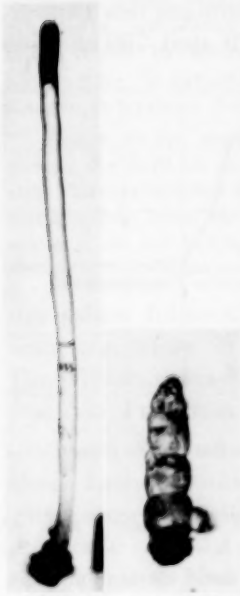

Abb. 13 Abb. 14

Abb. 13. Protonema nach 6 Tagen Rotlicht (135fach vergr., Filter 649, 200 erg/cm²sec)

Abb. 14. Protonema nach 6 Tagen Blaulicht (135fach vergr., Filter 445, 200 erg/cm²sec)

Das im Blaulicht gewachsene Chloronema (Abb. 14) ist zwar auch noch fädig, von einer apikalen Anordnung der Plastiden ist aber nichts mehr zu bemerken. Alle Zellen enthalten reichlich Plasma; die Apikalzelle besitzt anscheinend etwas mehr als die anderen, was mit ihrer höheren Embryonalität zusammenhängt. Dadurch ist die Apikalzelle immer noch von den anderen Zellen im Chloronema unterschieden. Bei der Teilung der Apikalzelle kann aber nur noch von einer „partiell inäqualen" Teilung gesprochen werden. Die neue Zellwand steht auch bei diesen Formen noch immer senkrecht auf der Längsachse des Chloronemas. Auf Grund der Lage der Plastiden und der Verteilung des Plasmas, auf Grund des ganzen übrigen Aussehens der Zellen kann man sagen, daß Längenwachstum *und* Polarität im Blaulicht eingeschränkt sind.

Die Zellteilung ist im Blaulicht gefördert (Abb. 15). Die Zellteilung ist also offensichtlich in den Bereichen gefördert, die das Längenwachstum der Zellen hemmen.

Dieses Resultat steht in merkwürdigem Gegensatz zu den Verhältnissen, die von AVERY und Mitarbeitern (1937) bei der Untersuchung des polaren Längenwachstums der *Avena*-Mesokotyle gefunden wurden, wo besonders die Zellteilung mit steigender Intensität des hemmenden Lichtes stark abnimmt.

Im Verlauf der Untersuchungen für Abb. 12 fiel es auf, daß die Rhizoide ebenfalls eine Abhängigkeit von der Lichtqualität zeigen. Obwohl kein Aktionsspektrum des Längenwachstums der Rhizoide aufgestellt werden konnte, läßt sich doch auf Grund zahlreicher Unter-

suchungen sagen, daß sich die Rhizoide unter den angegebenen Bedingungen hinsichtlich des Längenwachstums etwa umgekehrt verhalten wie die Chloronemen. Bei einer Intensität von 200 erg/cm²sec ist im Blaulicht das Wachstum der Rhizoide gefördert; im Bereich des intensivsten Längenwachstums der Chloronemen, im langwelligen Rot, wachsen die Rhizoide dagegen überhaupt nicht, sondern bilden lediglich kleine, verbreiterte Stummel. Bei der genannten Intensität beträgt z. B. nach 6 Tagen die mittlere Länge der Rhizoide unter Filter 486 = 171 μ und unter Filter 733 = 35 μ.

Laage (1907) fand, daß diejenigen Konzentrationen der Nährlösung, die das Rhizoidwachstum begünstigen, das Chloronemenwachstum

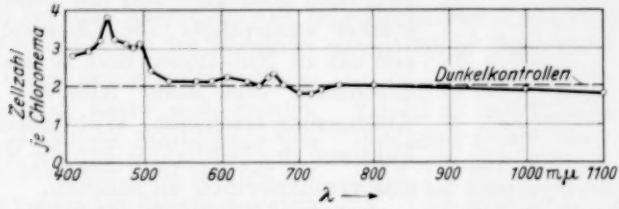

Abb. 15. Zellzahl je Chloronema in Abhängigkeit von der Wellenlänge. (Zellzahl nach 6 Tagen Kultur, Bedingungen wie bei Abb. 12)

hemmen und umgekehrt. In meinen Versuchen, wo die Nährstoffkonzentration in allen Fällen einigermaßen konstant ist, zeigt sich nun, in Abhängigkeit von der Lichtqualität, ein ähnliches Verhältnis von Chloronema- und Rhizoidwachstum. Nur dort, wo die Polarität sehr ausgeprägt ist, ist das Rhizoidwachstum minimal. Sobald die Polarität auch nur geringfügig gestört wird, werden die Rhizoide länger.

6. Versuche mit Farbglasfiltern (höhere Intensität)

Um das Verhalten der Protonemen bei höherer Intensität zu prüfen, konnten nur Farbglasfilter benützt werden, da sich mit den zur Verfügung stehenden Lampen die Intensität unter den Interferenzfiltern nicht wesentlich steigern ließ. Auch werden bei hoher Intensität die Restlichteffekte bei Verwendung von Interferenzfiltern unter Umständen beträchtlich.

Die Glasfilter wurden für diese Versuchsserie auf 4000 erg/cm²sec eingestellt. (Intensität unter den Filtern unter Vorschaltung von 4,5 cm Wasserschicht!) Wie bei den Versuchen mit Interferenzfiltern wurde nach 6 Tagen ausgewertet (Tabelle 1).

Die Werte zeigen, wie die breiten Spektralbereiche einebnend wirken. Vor allem das Blaulicht, das durch die Grün- und Gelbfilter hindurchgeht, beeinflußt die Ergebnisse in diesen Bereichen. Das eigentliche Ziel dieser Versuchsreihe ist jedoch erreicht: Es ist deutlich gezeigt,

daß der grundsätzliche Antagonismus zwischen kurz- und längerwelliger Strahlung bei höherer Intensität noch stärker ausgeprägt ist (besonders zu beachten sind Filter BG 7 und RG 9). Im Blaulicht ist das Längenwachstum vollständig unterdrückt, während im Bereich von 700—750 mμ das Längenwachstum noch um einiges gesteigert ist gegenüber den Verhältnissen bei niederer Intensität.

Abb. 17

Abb. 16

Abb. 16. Protonema nach 6tägiger Kultur unter Filter RG 9 (langw. Rot) bei einer Intensität von 4000 erg/cm²sec (135fach vergr.)

Abb. 17. Der an Stelle eines Protonemas entstehende mehrdimensionale Zellverband nach 6tägiger Kultur unter Filter BG 7 (Blaulicht) bei einer Intensität von 4000 erg/cm²sec (135fach vergr.)

Bei der Rotform (Abb. 16) ist der Aufbau prinzipiell derselbe wie bei den Dunkelformen und bei den Chloronemen im schwachen Rotlicht. Jedoch ist das Längenwachstum noch gesteigert und die Polarität noch stärker ausgeprägt. Die Chloronemen neigen oft zu Nutationen und zu gewundenem Wachstum (vgl. auch Abb. 23), was die Ausmessung erschwert. Wahrscheinlich sind Faktoren des Substrates für die Nutationen mit verantwortlich zu machen.

Bei der Blauform (Abb. 17) kann ein polares Wachstum nicht mehr festgestellt werden. Es entsteht nicht mehr ein fädiges Chloronema, sondern ein zwei- oder meist dreidimensionaler Zellverband, der aus annähernd gleichartigen Zellen zusammengesetzt ist. Die Zellteilungen sind also weitgehend äqual, entsprechend sind Plastiden und Plasma auf die Zellen annähernd gleichmäßig verteilt, und auch die Kerne unterscheiden sich in ihrer Gestalt nicht wesentlich. Eine Polaritätsachse, zu der die bei der Zellteilung gebildete Wand eine strenge Beziehung hat, ist nicht mehr feststellbar. (Die Zellen können nur als „annähernd gleichartig" bezeichnet werden, da jene Zellen, die sich zur Teilung anschicken, etwas

Tabelle 1. *Mittlere Länge durch mittlere Breite der Chloronemen in Abhängigkeit von der Lichtqualität* (nach 6 Tagen Kultur unter Glasfilter bei 4000 erg/cm²sec)

Filter	L/B	Filter	L/B
BG 3 (Violett) . . .	3,5 ± 0,1	RG 2 (Rot)	23,4 ± 0,7
BG 7 (Blau)	1,1 ± 0,1	RG 9 (langw. Rot) .	36,1 ± 0,9
VG 9 (Grün)	5,5 ± 0,3	Dunkelkontrolle . .	20,3 ± 0,7
OG 4 (Gelb)	19,3 ± 0,6		

mehr Plasma enthalten, besonders wenn sie die Funktion von „Scheitelzellen" haben.)

Beim Vergleich mit den Blauformen, die unter den Interferenzfiltern entstanden sind (vgl. Abb. 14), kann also nun festgestellt werden: Das polare Wachstum der Chloronemen, das schon bei der niederen Intensität eingeschränkt war, kann bei höherer Intensität im Blaulicht nicht mehr stattfinden. Es entstehen sofort zwei-, meist aber dreidimensionale Gebilde, die man als überstürzt entstandene, junge Prothallien auffassen kann. Sie sollen fernerhin Prothallien genannt werden.

7. Das Wachstum der Chloroplasten im monochromatischen Licht

Schon bei den Versuchen mit Interferenzfiltern war es aufgefallen, daß die Chloroplasten im Blaulicht wesentlich größer waren als in den übrigen Teilen des geprüften Spektrums. Ferner hatte sich gezeigt, daß eine erhebliche Neubildung von Plastiden über die Zahl der bei der Keimung gebildeten hinaus nur dort stattfand, wo das Längenwachstum und die polare Lagerung der Plastiden eine Einschränkung erfahren hatten, also im wesentlichen im Blaubereich. Die Verhältnisse wurden nun bei höherer Intensität im Glasfilterlicht etwas näher untersucht. Die Kulturbedingungen waren dieselben wie bei den soeben beschriebenen Versuchen mit Glasfiltern.

Tabelle 2. *Die Chloroplastengröße in Abhängigkeit von der Lichtqualität* (nach 6tägiger Kultur unter Glasfiltern bei 4000 erg/cm²sec. 1 relative Einheit = $^1/_{16}\,\mu$)

Filter	Plastidendurchmesser (in rel. Einheiten)
RG 9 (langw. Rot) .	55 ± 1,4
RG 2 (Rot)	72 ± 1,2
OG 4 (Gelb)	74 ± 1,4
VG 9 (Grün) . . .	94 ± 1,5
BG 7 (Blau). . . .	135 ± 1,6
BG 3 (Violett). . .	108 ± 1,3

Auch hier zeigte sich, daß die Plastidenneubildung nur dort erhebliche Ausmaße erreicht, wo das polare Wachstum gehemmt wird. Die Zellen der im Blaulicht gebildeten Prothallien sind mit großen Plastiden reichlich versehen. Im Rotlicht (RG 2) kommen bei der höheren Intensität auch Neubildungen vor, relativ zum Blaulicht ist die Neubildung jedoch geringer.

Um die Größenverhältnisse der Plastiden quantitativ zu untersuchen, wurden nach 6tägiger Kultur der Protonemen unter Glasfiltern die Plastiden mit dem Fadenokularmikrometer bei 750facher Vergrößerung gemessen, und zwar stets der größte Durchmesser. Im Durchschnitt wurden jeweils 40 Plastiden ausgemessen (Tabelle 2).

Auch nach relativ langer Kultur unter Glasfiltern sind die Größenunterschiede der Chloroplasten noch genau so beträchtlich, wie es eben für 6-Tage-Kulturen dargestellt wurde (Abb. 18 und 19).

Der Vergleich der Tabellen 1 und 2 legt die Vermutung nahe, daß Wachstum und Vermehrung der Plastiden dann gefördert werden, wenn Polarität und Längenwachstum reduziert werden. Je größer der Quotient L/B ist, um so kleiner bleiben die Plastiden. Die Größenunterschiede der Plastiden beruhen sicherlich nicht auf einem so großen Unterschied im Stärkegehalt; wie das Licht aber wirkt und welche Korrelationen eine wichtige Rolle spielen, ist gänzlich unbekannt.

Abb. 18. Blaulichtplastiden (nach 20tägiger Kultur unter BG 7 bei einer Intensität von 4000 erg/cm²sec, 585fach vergr.)

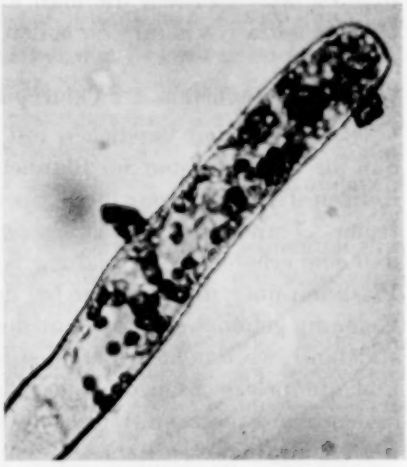

Abb. 19. Rotlichtplastiden (nach 20tägiger Kultur unter RG 9 bei einer Intensität von 4000 erg/cm²sec, 585fach vergr.)

Ein anderes der dargestellten Phänomene, nämlich die erhöhte Zellteilung im Blaulicht, kann aber vielleicht nun eine gewisse Erklärung finden (vgl. Abb. 15).

BAUER (1942) gibt für Moosprotonemen an, daß der normalen Kern- und Zellteilung eine Teilung der Plastiden vorangehe und daß die Chloroplastenteilung offenbar als begrenzender Faktor der Zellteilung auftrete. Vielleicht ist es bei den Farnprotonemen ähnlich. Da Wachstum und Teilung der Chloroplasten unter den angegebenen Bedingungen außerhalb des Blaubereiches gering sind, so kann man die außerhalb des Blaubereiches geringe Intensität der Zellteilung korrelativ deuten. Die Frage, in welcher Weise das Licht auf Wachstum und Teilung der Plastiden einwirkt, bleibt aber unbeantwortet.

8. Glasfilterversuche mit verschiedenen Intensitäten

Aus den bisher dargestellten Untersuchungen geht hervor, daß Längenwachstum und Struktur der Chloronemen entscheidend von der Qualität des eingestrahlten Lichtes abhängen und daß innerhalb der einzelnen Lichtqualitäten die verwendete Intensität eine große Rolle spielt. Für Blau, Rot und langwelliges Rot wurde nun diese Intensitätsabhängigkeit etwas näher untersucht.

Die Durchführung der Versuche erfolgte in der üblichen Weise. Tabelle 3 enthält die gefundenen Werte.

a) Die Blaulichtserie. Bei sehr geringer Intensität unter Filter BG 7 wird das Längenwachstum der Chloronemen gegenüber der Dunkelform nur wenig verändert. Auch bleibt die polare Struktur der Dunkelform weitgehend erhalten. Bei seitlicher Beleuchtung genügt aber diese geringe Intensität durchaus, um die Chloronemen phototropisch zu beeinflussen. Die phototropische Empfindlichkeit ist also größer als die Empfindlichkeit der polaren Struktur. Die Beeinflussung der Chloronemengestalt erfordert höhere Intensitäten als die Beeinflussung der

Abb. 20 Abb. 21

Abb. 20. Protonema nach 6tägiger Kultur unter Blaufilter (BG 7) bei niederer Intensität (400 erg/cm²sec, 135fach vergr.)

Abb. 21. Protonemen nach 6tägiger Kultur unter Blaufilter (BG 7) bei mittlerer Intensität (1200 erg/cm²sec, 135fach vergr.)

Wachstumsrichtung. Bei dieser niederen Intensität unter BG 7 findet noch keine wesentliche Neubildung von Plastiden statt, sondern auch in dieser Hinsicht bleiben die Verhältnisse wie bei der Dunkelform.

Bei einer Intensität von 400 erg/cm²sec unter Filter BG 7 ist das Längenwachstum schon deutlich eingeschränkt und die polare Struktur aufgelockert (Abb. 20). Bei einer Intensität von 1200 erg/cm²sec ist die polare Struktur weiter verwischt, Zellteilung, Chloroplasten- und Plasmabildung sind gefördert (Abb. 21). Die Ergebnisse der Versuche mit höherer Intensität (4000 erg/cm²sec) sind bereits besprochen (vgl. Abb. 22).

Tabelle 3. *Mittlere Länge durch mittlere Breite der Chloronemen in Abhängigkeit von der Intensität im Blaulicht, Rotlicht und langwelligen Rotlicht* (nach 6tägiger Kultur unter Glasfiltern. 1 Intensitätseinheit = 1 I.E. beträgt etwa 400 erg/cm²sec)

	L/B bei 1 I. E.	L/B bei 3 I.E.	L/B bei 10 I.E.
RG 9 (langw. Rot) . .	31,1 ± 0,6	32,9 ± 0,8	36,1 ± 0,9
RG 2 (Rot).	27,1 ± 0,6	26,5 ± 0,5	23,4 ± 0,7
BG 7 (Blau)	7,0 ± 0,3	3,4 ± 0,1	1,1 ± 0,1
Dunkelkontrolle	20,3 ± 0,7		

Zusammenfassend zeigt diese Blauserie, daß offensichtlich eine Abhängigkeit der Einschränkung des Längenwachstums und der Aufhebung der Polarität von der eingestrahlten Intensität besteht.

Abb. 22. Der an Stelle eines Protonemas sich bildende mehrdimensionale Zellverband nach 6tägiger Kultur unter Blaufilter (BG 7) bei höherer Intensität (4000 erg/cm²sec, 135fach vergr.). Entspricht Abb. 17

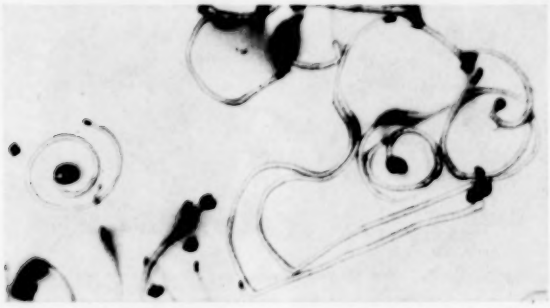

Abb. 23. Protonemen nach 24tägiger Kultur unter Rotfilter (RG 2) bei einer Intensität von 1200 erg/cm²sec (45fach vergr.)

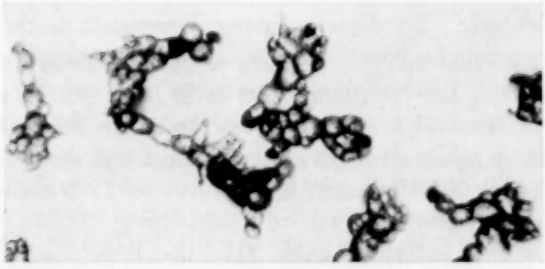

Abb. 24. Junge Prothallien nach 24tägiger Kultur unter Blaufilter (BG 7) bei einer Intensität von 1200 erg/cm²sec (45fach vergr.)

Hinsichtlich der Wirkung abgestufter Intensitäten gilt: Sehr geringe Intensitäten: Nur für phototropische Beeinflussung ausreichend. Schwache bis mittlere Intensität: Einschränkung des Längenwachstums, Beginn der Polaritätsstörung, Förderung der Plastidenbildung und der Zellteilung. Höhere Intensität: Aufhebung des polaren Wachstums der Zellen.

b) Die Rotlichtserien. Nach einer anfänglichen starken Förderung bei niederer Intensität wird mit steigender Intensität im Rotlicht (RG 2)

der Quotient L/B langsam wieder kleiner, während das Längenwachstum der unter Filter RG 9 (langw. Rot) wachsenden Chloronemen innerhalb des geprüften Bereichs mit steigender Intensität langsam weiter zunimmt. Allerdings sind diese Veränderungen nur quantitativer Art und relativ gering. Auffällig ist, daß der schwachen Verringerung des Längenwachstums im Rotlicht (RG 2) eine leichte Störung der Polarität (erkennbar an der Lagerung der Plastiden) und eine erhebliche Zunahme der Rhizoidlänge parallel gehen, während unter RG 9 stets eine straffe Polarität zu beobachten ist und bei der höheren Intensität nur Stummelrhizoide festzustellen sind.

c) An dieser Stelle soll noch ein Versuch erwähnt werden, der Aufschluß gibt über die Verhältnisse nach 24tägiger Kultur im Rot- und im Blaulicht (Intensität: 1200 erg/cm²sec). Abb. 23 zeigt die Rotform. Die Chloronemen sind sehr lang geworden (bis 2,6 mm!), haben ihren Aufbau im Prinzip aber nicht geändert. Im Gegensatz dazu haben sich im Blaulicht kleine Prothallien gebildet (Abb. 24). Abb. 25 zeigt Prothallien nach 20tägiger Kultur unter BG 7 bei einer Intensität von 4000 erg je cm²sec.

Abb. 25. Prothallien nach 20tägiger Kultur unter Blaufilter (BG 7) bei einer Intensität von 4000 erg/cm²sec (135fach vergr.)

Im Rotlicht erfolgt also keine Prothallienbildung, sondern die Form des polar differenzierten Chloronemas wird beibehalten. Ohne kurzwellige Strahlen kann der Übergang vom Protonema- zum Prothalliumstadium anscheinend nicht erfolgen. Erst wenn die Polarität im Chloronema abgebaut wird, kann es zum mehrdimensionalen Wachstum und damit zur Prothallienbildung kommen. Bei höherer Intensität im Blaulicht erfolgt die Aufhebung der Polarität überstürzt, und es entstehen sofort dreidimensionale Zellverbände, die jungen Prothallien entsprechen. Bei mäßiger Intensität des Blaulichtes tritt, wie im Fall der Abb. 24, ein genügend großer Polaritätsverlust im Chloronema erst nach 1—3 Zellteilungen ein, so daß ein 2—4zelliges Chloronema gebildet wird, ehe das zweidimensionale Wachstum des Prothalliums beginnt.

Der eben geschilderte Vorgang dürfte auch der normale Ablauf der Farnvorkeimentwicklung im natürlichen Biotop sein: Sobald blaues Licht in genügend hoher Intensität zugegen ist — was dann der Fall ist, wenn die Intensität des weißen Lichtes ansteigt —, kommt es mehr oder weniger schnell zu einem Polaritätsverlust der Apikalzelle und damit des Chloronemas. Dadurch wird ein zwei- oder dreidimensionales Wachstum ermöglicht.

Ähnliche Beziehungen bestehen wohl auch bei anderen Pflanzen. So berichtet BETR (1955) von *Acetabularia*, daß für die Hutbildungsprozesse unbedingt Licht nötig ist, daß eine Erhöhung der Lichtmenge die Hutbildung beschleunigt und die Stiele um so kürzer bleiben, je mehr Licht geboten wird. DAO (1954) gibt an, daß bei Lichtintensitäten zwischen 150 und 2400 Lux *Acetabularia mediterranea* das Optimum des Längenwachstums bei 1300 Lux zeigt. Eine prinzipiell ähnliche Optimumkurve für verschiedene Weißlichtintensitäten ließe sich auch für die Farnprotonemen aufstellen. Sie kann folgendermaßen gedeutet werden: Die das Längenwachstum fördernde Wirkung langwelligen Lichtes erreicht schon bei relativ niedriger Intensität ein Maximum, während der intensitätsabhängige Blaulichteffekt mit zunehmender Intensität dieser Lichtqualität immer stärker wird und bei höherer Intensität des Weißlichtes ganz in den Vordergrund tritt. Die Wuchsform bei einer bestimmten Weißlichtintensität ist das Ergebnis antagonistischer Beeinflussungen durch verschiedene Spektralbereiche! Die Stärke der verschiedenartigen Effekte ist von den jeweiligen Intensitäten der verschiedenen Lichtqualitäten abhängig. Hinter dem einheitlich erscheinenden Weißlichteffekt verbergen sich somit ganz verschiedenartige Beeinflussungen des Zellwachstums. Es scheint mir möglich, daß auch bei *Acetabularia* eine spektrale Analyse der Wachstums- und Differenzierungsvorgänge zu ähnlichen Resultaten führen könnte wie bei Farnprotonemen.

Aus der älteren Literatur sei noch erwähnt: An den Vorkeimen von *Batrachospermum* bilden sich nur bei höherer Lichtintensität *Batrachospermum*pflanzen aus (GOEBEL 1889). Zur Anlage der Moosknospen am Protonema ist höhere Lichtintensität erforderlich als zum Wachstum des Protonemas (KLEBS 1893). Die Vorkeime von *Preissia commutata*, die sich nur bei höherer Intensität aus der Fadenform entwickeln, bilden beim Sinken der Lichtintensität wieder Keimschläuche aus (SCHOSTAKOWITSCH 1894). Diese Beobachtung von SCHOSTAKOWITSCH wird im nächsten Abschnitt ihre Erklärung finden.

9. Versuche über die Wirkung von Blaulicht nach vorhergegangener Rotlichteinstrahlung und umgekehrt

Weiterhin war nun zu untersuchen, wie sich die streng polar differenzierten Rotlichtchloronemen verhalten, wenn sie plötzlich Blaulicht ausgesetzt werden, und wie sich die im Blaulicht entstandenen prothallienähnlichen Gebilde verhalten, wenn man sie mit Rotlicht bestrahlt.

Von KLEBS (1893, 1916, 1917) und STEPHAN (1928) war schon festgestellt worden, daß ein Wechsel in den Lichtverhältnissen ein Auswachsen von Prothalliumzellen zur Folge haben kann. Es wurde auch gefunden, daß Spektralbereiche, die für das Längenwachstum der Keimschläuche günstig sind, auch das Auswachsen fördern.

Die Versuchsanordnung ist folgende: Protonemen werden 6 Tage im langwelligen Rotlicht gehalten (RG 9). Dann werden sie weitere 6 Tage intensitätsgleichem Blaulicht (BG 7) ausgesetzt. Die Intensität beträgt 4000 erg/cm²sec. Umgekehrt werden die nach 6tägiger Kultur im Blaulicht entstandenen Formen weitere 6 Tage dem intensitätsgleichen Licht unter Filter RG 9 ausgesetzt.

Nach 12 Tagen zeigen sich folgende Ergebnisse: Die Rotlichtchloronemen werden sogleich nach Einsetzen des Blaulichtes in ihrem polaren

Wachstum gehemmt. Es kommt zu einer Auflösung der Polarität im Chloronema, damit zu einem allseitigen Wachstum in der Apikalzelle und zu Zellteilungen, die zu zwei- oder dreidimensionalen Gebilden führen. Diese Gebilde entsprechen genau den Prothallien, die im Blaulicht an Stelle eines primären Chloronemas entstehen (Abb. 26).

Abb. 26. Das Ergebnis einer 6tägigen Bestrahlung mit Blaulicht (4000 erg/cm²sec) nach vorhergegangener 6tägiger Kultur im langw. Rotlicht gleicher Intensität (135fach vergr.)

Die Zellfäden, die im Rotlicht entstanden sind, wirken nach der Blaulichtbehandlung leicht verbreitert. Es bilden sich in ihnen nachträglich im Blaulicht zahlreiche Plastiden aus, die nun aber nicht mehr polar angeordnet sind, sondern gleichmäßig die Zellen erfüllen. Dies dürfte ein Zeichen dafür sein, daß die Polarität im gesamten Chloronema aufgelöst ist.

Bei den Blaulichtformen sind nach der Rotlichtbehandlung an fast allen Prothallien eine oder seltener mehrere Zellen zu langen Schläuchen ausgewachsen, die in ihrem Aufbau identisch sind mit Rotlichtchloronemen (= primären Chloronemen). Es wird also in gewissen Prothalliumzellen eine neue Polarität ausgebildet und ein polar strukturierter Keimschlauch ausgetrieben (Abb. 27). Die auswachsenden Zellen werden oft an ihrer Basis ziemlich plastidenfrei; denn die meisten Plastiden wandern an die Spitze des austretenden „Sekundärchloronemas".

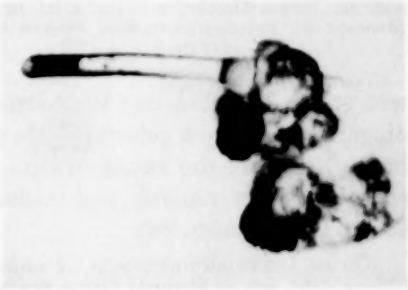

Abb. 27. Auswachsendes Sekundärchloronema nach 6tägiger Kultur im langw. Rotlicht (RG 9) nach vorhergegangener 6tägiger Kultur im Blaulicht (Intensität 4000 erg je cm²sec, 135fach vergr.)

Man kann dieses Auswachsen der Prothalliumzellen mit bereits beschriebenen Regenerationsvorgängen, z. B. mit der Bildung von Adventivprothallien vergleichen.

So hat Isaburo Nagai (1914) durch Plasmolyse an Prothallien das Auswachsen von Zellen angeregt. Man vergleiche ferner die Darstellungen von Linsbauer (1926) und Albaum (1938). Beide Autoren erreichten das Auswachsen von Prothalliumzellen, wenn sie die Verbindung dieser Zellen mit dem Meristem auflösten. Der Schluß liegt nahe, daß im normalen Wachstum des Prothalliums ein im Meristem entstehender Stoff das Auswachsen der Prothalliumzellen verhindert.

In unserem Fall erhebt sich die Frage, wie es zu erklären ist, daß aus den jungen, wenigzelligen, dreidimensionalen Prothallien, deren Zellen noch weitgehend embryonal sind, im Rotlicht sofort 1 oder seltener mehrere Schläuche auswachsen, die in ihrem ganzen Aufbau den primären Chloronemen entsprechen.

Hält man im Anschluß an die Blaulichtkultur die gebildeten kleinen Prothallien im Dunkeln, so kann man nach 6 Tagen feststellen, daß nur an wenigen Prothallien ($< 10\%$) Zellen ausgewachsen sind. Dieses Ergebnis zeigt, daß durch langwelliges Licht das Auswachsen außerordentlich begünstigt wird.

Abb. 28. Riesenrhizoide, wie sie z. B. im schwachen Blaulicht an Blaulichtprothallien entstehen; vgl. Text. (135fach vergr.)

In schwachem Blaulicht von einer Intensität, die auf die Chloronemen noch keine erhebliche morphogenetische Wirkung ausübt, findet kein Auswachsen von Sekundärchloronemen statt. Lediglich das Wachstum der Rhizoide ist unter diesen Bedingungen energisch gefördert. Es entstehen sehr lange und auch relativ breite Rhizoide, die zuweilen eine stattliche Anzahl von Chloroplasten enthalten, aber niemals eine polare Differenzierung zeigen wie etwa Chloronemen (Abb. 28).

Ob es Umwandlungen von Chloronemen und Rhizoiden auch bei Farnvorkeimen gibt, wie es FITTING (1950) für Moosprotonemen beschrieben hat, ist noch nicht sicher zu entscheiden. Wohl konnten Rhizoide beobachtet werden, die relativ sehr breit und lang geworden waren, die zahlreiche kleine Plastiden enthielten und einen ovalen Kern besaßen. Es ist mir aber nicht gelungen, ein Rhizoid aufzufinden, in welchem allmählich eine polare Anordnung des Kerns und der Plastiden eingetreten wäre, auch erwiesen sich alle beobachteten Rhizoide immer noch als wesentlich schmäler als die dazugehörigen Chloronemen.

Ob eine Prothalliumzelle also auswachsen kann oder nicht, ist, bei sonst konstannten Kulturbedingungen, von der Wellenlänge des eingestrahlten Lichtes abhängig, nicht etwa von der Intensität, wie zuweilen vermutet wurde, weil nur bei niederen Weißlichtintensitäten ein Auswachsen beobachtet wurde (ISABURO NAGAI 1914). Lediglich jener Spektralbereich, der das Längenwachstum und die polare Differenzierung der Primärchloronemen fördert, ist auch wirksam bei der Bildung von Sekundärchloronemen. Der Effekt verschiedener Weißlichtintensitäten läßt sich indessen auch hier leicht erklären: Wie in Abschnitt 8 festgestellt wurde, hat die fördernde Rotlichtwirkung schon

bei niederer Intensität fast ein Maximum erreicht, während die Wirkung des Blaulichtes erst bei höherer Intensität voll zur Geltung kommt.

Bei niederer Intensität des Weißlichtes ist also der Rotlichteffekt zu erwarten und bei hoher Intensität der Blaulichteffekt, wie es auch von Nagai, Klebs u. a. beobachtet wurde.

Man könnte vermuten, daß im Dunkeln deshalb das Auswachsen so selten erfolgt, weil ein Mangel an Assimilaten herrscht. Dies scheint aber nicht zuzutreffen, denn man kann oft in den Chloroplasten der 6 Tage im Dunkeln gehaltenen Prothallien noch stattliche Stärkekörner nachweisen. Oft wächst je Prothallium nur *eine* Zelle aus, seltener mehrere. Es scheint, daß das auswachsende Sekundärchloronema die übrigen Zellen am Auswachsen hindert.

10. Phototropische Reaktionen der Protonemen

Wie schon eingangs erwähnt, sind die Chloronemen phototropisch sehr empfindlich, im Gegensatz zu den Rhizoiden, die unter den angewandten Bedingungen sehr viel träger oder gar nicht reagieren.

Es liegen orientierende Versuche mit schwachem Weißlicht (seitliche Beleuchtung, Wasserfilter) und mit farbigem Licht vor (Glasfilter, etwa 400 erg/cm²sec, seitliche Beleuchtung, Wasserfilter).

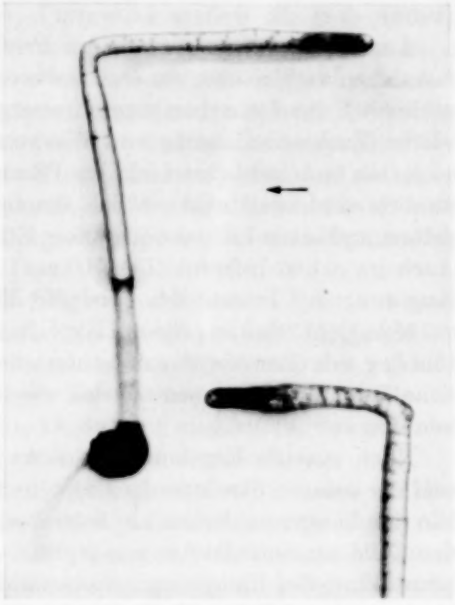

Abb. 29. Positive und negative phototropische Krümmungen bei Chloronemen. (Der Pfeil gibt die Lichtrichtung an; 135fach vergr.)

Die Protonemen erhielten 4 Tage seitliches Weißlicht, dann, nach Drehung um 90°, 2 Tage Filter- oder Weißlicht. Nach jeweils 6 Tagen wurde der Versuch abgebrochen.

Die Schwerpunkte der phototropischen Wirksamkeit liegen im blauen *und* im roten Spektralbereich. Oberhalb von 700 mμ ist die Wirksamkeit sehr gering, geringer als im Rotlicht ist der Effekt auch zwischen 500 und 600 mμ.

Bei den Versuchen fiel auf, daß zwar die Mehrzahl der Chloronemen positive Krümmungen ausführt, aber auch negative Krümmungen vorkommen. Wenn die Anzucht unter den angegebenen Bedingungen im seitlichen schwachen Weißlicht erfolgte, so reagierten etwa 10% der Chloronemen negativ phototropisch (Abb. 29).

11. Besprechung der bisherigen Versuchsergebnisse

Ein gemessenes Aktionsspektrum hängt entscheidend davon ab, in welcher Weise man das farbige Licht dem Organismus bietet. Der Effekt energiegleicher Spektralbereiche scheint z. B. ganz verschieden zu sein, wenn man höhere Pflanzen einmal ausschließlich im farbigen Licht höherer Intensität aufzieht und das andere Mal die einzelnen Spektralbereiche lediglich als Zusatzlicht geringerer Intensität bietet [vgl. besonders die Zusammenfassungen von WASSINK (1954) und STOLWIJK (1954); dort die weitere Literatur].

Am besten lassen sich die an Protonemen gewonnenen Ergebnisse mit denen vergleichen, die erzielt wurden, als man höhere Pflanzen ausschließlich im Licht bestimmter, energiegleicher Spektralbezirke kultivierte (Zusammenfassung von WASSINK 1954). Es zeigte sich, daß im violetten und im blauen Licht die Pflanzen den Weißlichtkontrollen sehr ähnlich sind, daß aber in den längerwelligen Bereichen des grünen, gelben und roten Lichtes ein starkes Etiolement der Internodien auftritt. Auch im nahen Infrarot ($\lambda > 700$ mμ) zeigte sich eine sehr starke Verlängerung der Internodien, und die Blätter blieben klein.

Man sieht, daß bei diesen Experimenten, die in der Versuchsdurchführung den Protonemenversuchen am meisten entsprechen, ganz ähnliche Resultate gewonnen wurden wie bei der Untersuchung der Chloronemen.

Nach unseren Ergebnissen besteht zwischen dem Längenwachstum und der polaren Struktur der Chloronemazelle eine sehr enge Beziehung. Wo das Längenwachstum am stärksten ist, ist auch die polare Struktur der Zelle am intensivsten ausgeprägt. Umgekehrt bedeutet eine Einschränkung des Längenwachstums einen Zerfall der Polarität. Längenwachstum und Polarität des wachsenden Chloronemas lassen sich wohl begrifflich trennen, faktisch sind sie aber aufs engste verbunden.

Es darf also mit Recht vermutet werden, daß Faktoren, die das Längenwachstum fördern, auch für die Aufrechterhaltung der polaren Struktur wesentlich sind.

ALBAUM (1938) konnte zeigen, daß der Wuchsstoff der Farnprothallien mit dem Wuchsstoff der *Avena*-Koleoptile wahrscheinlich identisch ist, daß er polar geleitet wird und durch IES ersetzbar ist. Es soll deshalb hier versucht werden, diesen stofflichen Faktor Auxin auch für das Verständnis der polaren Struktur im Chloronema heranzuziehen. Dabei muß aber folgende wesentliche Voraussetzung gemacht werden: Die Polarität des Chloronemas hat sich als labil erwiesen. Die Vorstellung einer an die starren, peripheren Schichten des Plasmas gebundenen Polarität entspricht hier also nicht den Tatsachen. Die Polarität der Zelle ist bei unserem Objekt das Ergebnis eines dynamischen Gleichgewichtszustandes, welcher unter bestimmten Bedingungen zu

einer asymmetrischen Stoffverteilung und zu einer strukturellen Asymmetrie in der Zelle führt.

Eine wesentliche Komponente des hochkomplexen, dynamischen Systems in der polarisierten Zelle ist der Auxingradient, der vom apikalen zum basalen Pol reicht. Wird dieser Auxingradient zerstört, so bricht das dynamische Gefüge der Zelle und damit die Polarität zusammen. Es sei angenommen, das Auxin werde apikal gebildet und werde polar zum basalen Pol transportiert. Dadurch kann ein Gradient zustande kommen.

Je größer nun die Produktion von Auxin ist, um so optimaler ist der Gradient ausgebildet, um so straffer wird die polare Struktur, um so intensiver wird das Längenwachstum (wenigstens solange, bis andere Faktoren das Ausmaß des Längenwachstums begrenzen oder eine überoptimale Wuchsstoffkonzentration erreicht wird). Solange die polare Struktur des Chloronemas und damit der Wuchstoffgradient vorhanden sind, kommt es nicht zur Bildung eines zwei- oder dreidimensionalen Prothalliums.

Hinsichtlich der hemmenden Wirkung des kurzwelligen sichtbaren Lichtes auf Längenwachstum und Polarität gibt es zwei Möglichkeiten: Entweder wirkt das Licht zerstörend auf das Auxin, was der vieldiskutierten Photolyse der IES durch Vermittlung gelber Pigmente entspricht, oder das Licht hemmt die Produktion von Auxin, was gleichfalls zu einer Auflösung des Auxingradienten führen kann.

Es konnte in der vorliegenden Arbeit gezeigt werden, daß im Blaulicht mit steigender Intensität die Polarität des Chloronemas immer mehr aufgehoben wird und entsprechend das polare Längenwachstum der Apikalzelle immer mehr nachläßt. Bei genügend hoher Intensität kommt es zu einem allseitigen Wachstum und somit zu nahezu isodiametrischen Zellen. Die Annahme einer durch Vermittlung gelber Pigmente (etwa Riboflavin) im Blaulicht ablaufenden Inaktivierung des Auxins erklärt den Zerfall des Gradienten und damit den Zusammenbruch der polaren Struktur. Das bei der Sporenkeimung wirksame blauabsorbierende Pigment ist vielleicht mit dem beim Chloronemenwachstum wirksamen Sensibilisator identisch (Mohr 1956).

Vermutlich geht die Förderung des Längenwachstums der Chloronemen auf die Absorption im Chlorophyll und den dadurch bedingten Aufbau von Verbindungen zurück, die für das Wachstum wesentlich sind. Auch Wuchsstoffe könnten zu diesen Verbindungen gehören. Überlagert wird diese Chlorophyllwirkung durch die Absorption in zwei anderen Pigmenten, einem blauabsorbierenden, dessen Wirkungsweise bereits diskutiert wurde, und einem rotabsorbierenden.

Das Rotlicht wirkt schwach hemmend auf das Längenwachstum, verglichen mit den angrenzenden Spektralbereichen. Während also das

vom Chlorophyll absorbierte Rotlicht das Längenwachstum fördert und vielleicht auch die Auxinsynthese begünstigt, bewirkt die von dem anderen rotabsorbierenden Pigment aufgenommene Strahlung vielleicht eine Inaktivierung des Auxins und damit eine Einschränkung des Längenwachstums und der polaren Struktur. Während die synthetischen Vorgänge in der Zelle, die mit dem Längenwachstum zusammenhängen, schon bei einer relativ geringen Energieeinstrahlung fast das Maximum erreichen, ist das Ausmaß der Inaktivierung von Wuchsstoff durch das Rotlicht der absorbierten Strahlung proportional und nimmt deshalb mit steigender Lichtintensität zu, allerdings ziemlich langsam. Daraus ergibt sich die Situation, daß bei einer relativ geringen Energieeinstrahlung das Längenwachstum stärker gefördert wird als bei höherer Intensität, weil mit steigender Absorption in dem angenommenen Rotpigment die Wuchsstoffinaktivierung zunimmt und der Wuchsstoff dann als limitierender Faktor des Längenwachstums in Erscheinung tritt. Verglichen mit der Auxininaktivierung im Blaulicht bleibt die Inaktivierung im Rotlicht stets gering. Deshalb werden im Rotlicht auch bei höherer Intensität keine Prothallien gebildet.

Eine morphogenetische Wirksamkeit von Rotlicht wurde schon öfters gezeigt, z. B. von LANGE (1929) bei der Untersuchung der Lichtwirkung auf das *Avena*-Mesokotyl. WENT (1941) und PARKER und Mitarbeiter (1949) fanden eine besonders starke Hemmwirkung des Rotlichts auf das Längenwachstum der Internodien etiolierter Erbsenkeimlinge.

Es ist schon vor längerer Zeit erkannt worden (vgl. BÜNNING 1937), daß offensichtlich auch rotabsorbierende Pigmente phototropische Reaktionen einleiten können, ohne daß dabei allerdings die Wirksamkeit der gelben Pigmente erreicht wird. Man muß vermuten, daß das wirksame Rotlicht vom Chlorophyll oder von chlorophyllähnlichen Verbindungen absorbiert wird (GALSTON 1950). Auch bei den Chloronemen ließ sich eine starke phototropische Wirksamkeit des roten Lichtes nachweisen. Diese könnte grundsätzlich auch mit einer Auxininaktivierung, und zwar durch Absorption in einem rotabsorbierenden Pigment erklärt werden. Daß hier neben positiven Krümmungen auch negative auftreten, wird unter der Annahme erklärbar, daß der Auxingehalt bei den meisten Chloronemen unter den angeführten Bedingungen nahezu optimal, bei einem gewissen Prozentsatz aber überoptimal ist. Diese letzteren müßten dann bei Auxininaktivierung eine negative Krümmung zeigen.

Eine Deutung des unterschiedlichen Verhaltens von Chloronema- und Rhizoidwachstum kann nicht gegeben werden. Vielleicht spielt der Auxingehalt an der Basis der Chloronemen eine wesentliche Rolle, vielleicht ist auch die Konkurrenz um gewisse Stoffe daran beteiligt, daß das Rhizoid kurz bleibt, wenn das Längenwachstum der Chloronemen sehr stark ist, und daß das Rhizoid dann wächst, wenn Polarität und Längenwachstum im Chloronema eingeschränkt sind. Da das Rhizoid

meist äußerst plastidenarm ist und auch phototropisch wenig empfindlich ist, so darf man wohl annehmen, daß es direkt vom Licht nur wenig beeinflußt wird.

Das Auswachsen der Prothalliumzellen im langwelligen Licht läßt sich folgendermaßen erklären: Das prothalliumähnliche Blaugebilde ist verarmt an Wuchsstoff. Deshalb kommt es im Dunkeln nur selten zum Auswachsen von Sekundärchloronemen, denn die Ausbildung dieser Keimschläuche setzt voraus, daß in der Zelle sich von neuem eine polare Struktur ausbildet, also auch die Ausbildung eines Auxingradienten möglich ist. Dies kann aber in den meisten der vorliegenden Zellen nur im Licht geschehen, und zwar nur im Licht jener Spektralbereiche, die auch das Längenwachstum der primären Chloronemen fördern. In der Apikalregion der im längerwelligen Licht auswachsenden Sekundärchloronemen wird reichlich Auxin gebildet, welches basalwärts strömt und sich in den umgebenden Zellen des Prothalliums in überoptimaler Konzentration anreichert und somit einem Auswachsen der anderen Prothalliumzellen entgegenwirkt. Diese Vorstellung entspricht den Ergebnissen von Linsbauer (1926) und Albaum (1938), die das Auswachsen von Prothalliumzellen dadurch erreichten, daß sie ihre Verbindung mit dem Meristem auflösten. Ähnliches berichtet Meyer (1953).

Es zeigt sich also, daß der Wechsel *eines* Außenfaktors das dynamische Gleichgewicht der Zelle so ändert, daß aus der weitgehend isodiametrischen Blaulichtzelle ein Sekundärchloronema wird. In den hier beschriebenen Versuchen ist eindeutig das Blaulicht der entscheidende Faktor, der die isodiametrische Zellform bedingt. Fällt dieser Faktor weg, so kann sich in der Zelle ein anderer Gleichgewichtszustand einstellen, was im Dunkeln selten, im längerwelligen Licht häufig eintritt.

Wenn im Chloronema ein Auxingradient eine wesentliche Komponente der Zellpolarität ist, so muß sich die Polarität im Chloronema dadurch aufheben lassen, daß das Auxin zerstört wird. Dies kann offenbar durch Blaulicht geschehen. Das Ergebnis sind Zellen ohne polares Wachstum. Man könnte aber den Gradienten auch dadurch vernichten, daß im Überschuß allseitig IES zugeführt wird. Die weiteren Versuche, die nun zu schildern sind, gingen von dieser Vorstellung aus.

12. Versuche mit IES

a) Einleitung und Methode. Nach Heitz (1940) und von Wettstein (1953) ist es möglich, aus *Funaria*-Sporen durch Zusatz von IES an Stelle von Protonemen apolare Riesenkugeln zu erhalten. Von Wettstein fand, daß nicht nur die Polaritätsausbildung, sondern auch die Zellteilung durch IES verhindert wird. Es gibt aber für Farnvorkeime Konzentrationen von IES, bei denen zwar die Polarität im Chloronema weitgehend gestört wird, die Fähigkeit zur Zellteilung aber erhalten bleibt.

In den Versuchen wurden die Sporen wie üblich auf reinem Agar zum Keimen gebracht. Die Kultur der Protonemen erfolgte im Glühlampenlicht von etwa 1000 Lux, welches durch Neutralglas (Filter BG 21) gefiltert wurde, um einen Teil der infraroten Wärmestrahlung abzuschirmen. Die IES-Lösung wurde erst mit der Nährlösung zugefügt. Zusammen mit dieser diffundiert der Wuchsstoff in den

Abb. 30 Abb. 31

Abb. 30. Normale Sporenkeimung. Differenzierung in Chloronema und Rhizoidzelle (135fach vergr.)

Abb. 31. Keimung nach Zusatz von IES. Die Differenzierung bleibt aus (135fach vergr.)

Agar und gelangt an die Protonemen. Diese Methode bietet folgenden Vorteil: Die Keimung der Sporen wird durch die IES bei dieser Art der Zugabe nicht gestört. Die verwendeten höheren Konzentrationen wirken sich nämlich, ähnlich wie es DRAWERT (1949) von Samen berichtet, auf die Keimung mehr oder weniger hemmend und verzögernd aus. Wird die IES mit der Nährlösung zugefügt, so wirkt sie

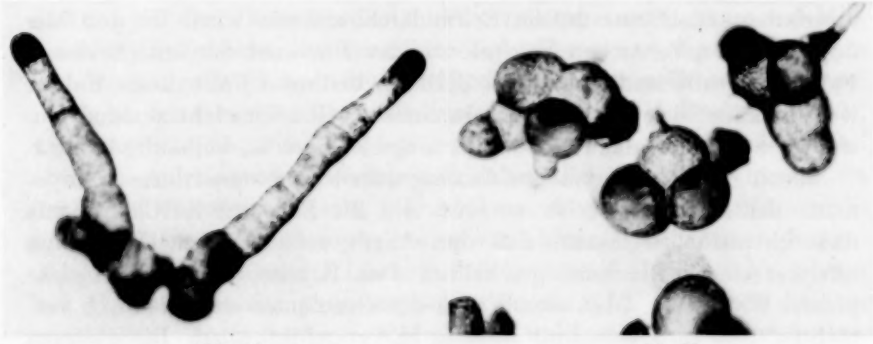

Abb. 32 Abb. 33

Abb. 32. Protonemen der Kontrollversuche ohne IES (135fach vergr., 6 Tage nach Versuchsbeginn)

Abb. 33. Der Einfluß von IES auf die Form der Protonemen (s. Text). Teilungsfähigkeit erhalten (135fach vergr., 6 Tage nach Versuchsbeginn)

erst in dem Zeitpunkt, wo das Wachstum beginnt, auf die Chloronemen ein. Zu dieser Zeit liegen bereits polar differenzierte Protonemen vor, da die Polarität bereits beim Keimvorgang in Erscheinung tritt. Daß IES, wenn man sie auf die keimenden Sporen in wirksamer Konzentration einwirken läßt, oft die Bildung des Rhizoids und offenbar auch die damit zusammenhängende polare Differenzierung verhindert, ließ sich auch nachweisen (Abb. 30 und 31).

Welche IES-Konzentrationen in der unmittelbaren Umgebung der Protonemen herrschen, kann bei dieser Methode nicht genau festgestellt werden.

b) Die Ergebnisse. Die ersten Effekte traten ein, wenn die zugefügte IES-Lösung etwa die Konzentration 17,5—35 · 10^{-6} g/ml hatte und 0,4 ml hinzugefügt wurden. Es zeigte sich eine Einschränkung des Längenwachstums und eine Auflockerung der Polarität, was schließlich, bei Konzentrationen von 35—70 · 10^{-6} g/ml, zu Formen führte, deren polares Wachstum weitgehend oder vollständig aufgehoben war (Abb. 33). Zellteilungen konnten aber trotzdem noch stattfinden. Wurde die Konzentration der zugefügten IES-Lösung noch mehr gesteigert (1 · 10^{-4} bis 1 · 10^{-3} g/ml), so wurde auch die Teilungsfähigkeit in Mitleidenschaft gezogen und es entstanden statt der Chloronemen jene schon von Moossporen her bekannten kugeligen Gebilde (Abb. 34).

Abb. 34. An Stelle von Protonemen entstehende Riesenkugeln, bei hoher Konzentration von IES (135fach vergr., 15 Tage nach Versuchsbeginn)

Wie durch Blaulicht, so läßt sich also auch durch die Zugabe abgestufter IES-Mengen zum Substrat eine teilweise oder vollständige Aufhebung der Polarität erreichen. Die Vitalität der Zellen wird dabei zunächst nicht erheblich geschädigt, wie Abb. 33 zeigt.

Um zu prüfen, ob der IES-Effekt nicht ein p_H-Effekt ist, wurde statt der IES-Lösung eine HCl-Lösung entsprechenden p_H-Wertes der Nährlösung zugefügt (p_H-Wert einer IES-Lösung der Konzentration 35 · 10^{-6} g/ml = 4,2; p_H-Wert der zugefügten HCl-Lösung = 4,0; Messungen mit p_H-Meter). Ein Effekt ließ sich hierbei nicht feststellen. Auch bei Pilzen ist es noch ungeklärt, ob derartige Effekte als p_H-Wirkungen aufgefaßt werden dürfen (vgl. Ritter, Yoshimura).

Yamasaki (1954) hat gezeigt, daß auch eine Behandlung auskeimender Farnsporen mit Colchicin zu ganz ähnlichen Gebilden führt, wie hier in dieser Arbeit als Folge einer IES-Behandlung entstanden sind. Auch Colchicin scheint also in polaritätswirksamen Konzentrationen die Zellteilung bei Farnvorkeimen nicht total zu hemmen.

Bekanntlich kann auch in wachsenden Zellen höherer Pflanzen eine allseitige Zufuhr von Wuchsstoff die polaren Leistungen der Zellen verschwinden lassen.

Daß auch durch einige andere Stoffe, wie etwa Colchicin (Yamasaki 1954) oder Gesarol (Döpp 1955), die polare Struktur der Farnchloronemen beeinflußt wird, spricht nicht gegen die Annahme eines Auxingradienten in der polaren Zelle. Es ist vielmehr ein weiteres Zeichen für die große Labilität solcher Gleichgewichtszustände, auf denen die Asymmetrie der Zelle beruht, daß sie leicht und durch recht verschiedene Außeneinflüsse gestört werden können.

13. Die Keimung der Sporen bei seitlich einfallendem Licht

Bei seitlich einfallendem Licht wird die Polarität in der keimenden Spore von der Lichtrichtung bestimmt. Das erste sichtbare Ereignis bei der Keimung ist die Sprengung des Exospors an einer vorgezeichneten

Naht. Wenn das Sporeninnere sichtbar wird, kann man mit Hilfe des Fluorescenzmikroskopes schon zahlreiche, scharf begrenzte Chloroplasten beobachten. An der noch ungeteilten Sporenzelle tritt nun auf der lichtabgewandten Seite eine Vorwölbung auf, die sich als Keimrhizoid bald von dem übrigen Sporeninhalt durch eine feine Querwand abtrennt. Das Keimrhizoid ist nahezu chloroplastenfrei. Die chloroplastenhaltige, grüne Sporenzelle streckt sich nun in der dem Keimrhizoid entgegengesetzten Richtung, also dem Licht entgegen. Dadurch

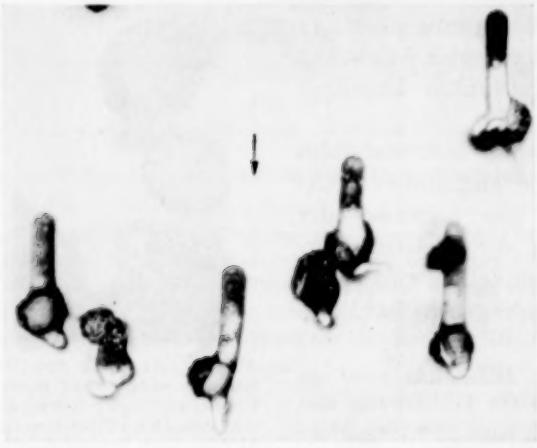

Abb. 35

Abb. 36

Abb. 35. Der Einfluß seitlich einfallenden Lichtes auf die polare Differenzierung der keimenden Sporen. (Der Pfeil gibt die Lichtrichtung an)

Abb. 36. Oben links: Spore von der Breitseite. Oben rechts: Spore von der Schmalseite mit „Naht". Unten links: Austretendes Rhizoid. Unten rechts: Austretendes Chloronema. (Die Pfeile geben die Lichtrichtung an.) Schematisiert

entsteht das Chloronema. Abb. 35 zeigt die Beeinflussung der Polarität durch einseitige Belichtung, Abb. 36 gibt einen Überblick über die beschriebenen, beim eigentlichen Keimvorgang beobachtbaren Vorgänge.

Form und Struktur des Exospors wirken sich auf den Keimvorgang erheblich aus, denn nur an der vorgezeichneten „Naht" reißt das Exospor auf und gibt den Sporeninhalt frei. Dies führt z. B. auch dazu, daß die Rhizoidzelle meistens dem basalen Pol des Chloronemas etwas seitlich ansitzt.

Fällt das Licht von oben auf die Sporen, so verlaufen Keimung und polare Differenzierung im Prinzip genau so, wie es eben für die seitliche Belichtung geschildert wurde, d. h. es tritt erst das Rhizoid auf, dann erfolgt das Auswachsen des Chloronemas. Jedoch ist in diesem Fall ein Einblick in polaritätsbeeinflussende Faktoren weniger gut möglich. Der Keimvorgang verläuft nicht immer nach dem angegebenen Schema, sondern kann erheblich variiert sein, z. B. kann die Ausbildung eines

Rhizoids unterbleiben oder erst erfolgen, wenn das Chloroneum bereits auswächst. Auch Einwirkungen des Substrates können den normalen Verlauf der Keimung abändern.

14. Schlußbesprechung

Die am meisten auffallende polare Leistung des Chloronemas ist das polare Wachstum. Es handelt sich also bei der Polarität des Chloronemas um die *labile* Polarität einer wachsenden Zelle bzw. eines wachsenden Fadens. Wir haben gesehen, daß durch Außeneinflüsse, die wahrscheinlich nicht direkt auf ein Proteingerüst der Zelle wirken können, ein Totalverlust der Polarität erreichbar ist.

Es wurde die Hypothese gebildet, daß im längerwelligen Licht ein bestimmter Auxingradient erhalten bleibt, während er im Blaulicht zerstört wird. Und wir hatten weiter geschlossen, daß für das dynamische Gleichgewicht der Zelle, welches eine asymmetrische Struktur zur Folge hat, das Bestehen eines Auxingradienten wesentlich ist.

Die Polarität des Chloronemas ist äußerst labil. Man kann sich aber vorstellen, daß die Polarität einer Zelle allmählich stabiler wird, daß sie nicht mehr so eng mit der polaren Wachstumsleistung verbunden ist und dann die leichte Beeinflußbarkeit aufhört. In diesem Zustand der Stabilisierung könnte dann die Anordnung mehr starrer plasmatischer Elemente besonders charakteristisch für die Asymmetrie der Zelle sein. Das statische Bild der Polarität dürfte für diesen Zustand stabiler Asymmetrie, der vielleicht bevorzugt bei manchen Zelltypen höherer Pflanzen und bei vielen zoologischen Objekten ausgebildet ist, zutreffend sein.

Vöchting (1906) mag eine ähnliche Gegenüberstellung im Auge gehabt haben, da er, im Hinblick auf Untersuchungen an Meeresalgen und an *Equisetum*-Sporen, die Meinung ausspricht, daß die hier gewonnenen Vorstellungen sich nicht unmittelbar auf die Verhältnisse übertragen lassen, die wir bei höheren Pflanzen beobachten. „Was dort noch beweglich, labil ist, hat hier eine festere Gestalt angenommen." Ob die Polarität in den Zellen der höheren Pflanzen immer so stabil ist, wie Vöchting vermutet hat, soll im Rahmen dieser Arbeit nicht weiter diskutiert werden. Dieses Problem ist schon zu Vöchtings Zeit lebhaft umstritten gewesen und auch in neuerer Zeit immer wieder kritisch behandelt worden (vgl. Bloch 1943 und Bünning 1953).

Zusammenfassung

Es wurde das Wachstum von Farnprotonemen *(Dryopteris filix-mas)* im monochromatischen Licht (Interferenzfilter) untersucht. Geprüft wurde der Bereich zwischen 400 und 1100 mμ. Eine im Blaulicht

eintretende starke Hemmung des Längenwachstums der Chloronemen ist mit einem teilweisen Verlust der polaren Struktur der Chloronemen verbunden. Zwischen 500 und 760 mμ werden Längenwachstum und polare Differenzierung gefördert, im roten Spektralbereich etwas weniger als in den angrenzenden Bereichen. Zwischen 760 und 1100 mμ konnte kein Einfluß der Strahlung auf die Protonemen festgestellt werden. Das Wachstum der Rhizoide ist unter diesen Bedingungen dem Längenwachstum der Chloronemen etwa umgekehrt proportional.

Bei höherer Intensität im Blaulicht (Glasfilter) ist das polare Wachstum des Chloronemas vollkommen gehemmt. Es entsteht sofort ein zwei- oder dreidimensionaler Zellverband, der einem Prothallium entspricht. Der Blaulichteffekt ist proportional der eingestrahlten Intensität. Dagegen sind im längerwelligen Licht auch bei höherer Intensität Längenwachstum und Polaritätsausbildung begünstigt. Allerdings scheint im Rotlicht mit steigender Intensität die Förderung des Längenwachstums langsam wieder abzunehmen.

Der Übergang vom Protonema zum Prothallium erfolgt offensichtlich nur dann, wenn kurzwelliges Licht in genügend hoher Intensität vorhanden ist. Denn nur durch kurzwelliges Licht ($\lambda <$ 500 mμ) von ausreichender Intensität wird das polare Wachstum des Chloronemas so stark gehemmt, daß es zu einem flächigen oder dreidimensionalen Wachstum kommen kann.

Die Größe der Chloroplasten ist dem Längenwachstum der Chloronemen etwa umgekehrt proportional.

Läßt man auf Chloronemen, die im längerwelligen Licht entstanden sind, Blaulicht höherer Intensität einwirken, so geht die Polarität in den Chloronemen sofort verloren. Wird das Blaulicht durch längerwelliges Licht ersetzt, so wachsen aus Zellen der im Blaulicht entstandenen Prothallien Sekundärchloronemen aus, die im ganzen Aufbau den aus den Sporen hervorgegangenen Primärchloronemen entsprechen.

Die Chloronemen sind phototropisch sehr empfindlich. Besonders wirksam sind blaues und rotes Licht.

Durch Einwirkung von IES kann ebenfalls ein Polaritätsverlust beim Chloronemenwachstum erreicht werden, wobei die Fähigkeit zur Zellteilung erhalten bleibt.

Die Polarität in der keimenden Spore wird bei seitlich einfallendem Licht von der Lichtrichtung bestimmt.

Die Untersuchungen zeigen, daß bei dem Versuchsobjekt eine labile Polarität besteht.

Für die Überlassung des Themas sowie für das stets rege Interesse am Fortgang der Arbeit danke ich Herrn Professor Dr. E. BÜNNING. Auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft bin ich zu großem Dank verpflichtet.

Literatur

Albaum, H. G.: Inhibitions due to growth hormones in fern prothallia and sporophytes. Amer. J. Bot. **25**, 124—133 (1938). — Avery, G. S., P. R. Burkholder and H. B. Creighton: Polarized growth and cell studies in the first internode and coleoptile of Avena in relation to light and darkness. Bot. Gaz. **99**, 125—143 (1937). — Bauer, L.: Untersuchungen zur Entwicklungsgeschichte und Physiologie der Plastiden von Laubmoosen. Flora (Jena) **136**, 30—84 (1942). — Beth, K.: Beziehungen zwischen Wachstum und Formbildung in Abhängigkeit von Licht und Temperatur bei Acetabularia. Z. Naturforsch. **10**b, 267—276 (1955). — Unterschiedliche Beeinflussung von Wachstum und Teilung durch Veränderung von Licht und Temperatur. Z. Naturforsch. **10**b, 276—281 (1955). — Bloch, R.: Polarity in plants. Bot. Rev. **9**, 261—310 (1943). — Bopp, M.: Die Entwicklung von Zelle und Kern im Protonema von Funaria hygrometrica Sibth. Planta (Berl.) **45**, 573—590 (1955). — Bünning, E.: Phototropismus und Karotinoide III. Weitere Untersuchungen an Pilzen und höheren Pflanzen. Planta (Berl.) **27**, 583—610 (1937). — Entwicklungs- und Bewegungsphysiologie der Pflanzen, 3. Aufl. Heidelberg 1953. — Czaja, A. Th.: Zellphysiologische Untersuchungen an Cladophora glomerata. Isolierung, Regeneration und Polarität. Protoplasma (Wien) **11**, 601—627 (1930). — Dao, S.: Comportement de l'Acetabularia mediterranea Lamour en culture. Étude de sa croissance. Rev. gén. Bot. **61**, 573—606 (1954). — Döpp, W.: Polyploidie und andere Erscheinungen bei Farnprothallien durch Wirkung von Gesarol und seinen Bestandteilen. Naturwiss. **42**, 99—100 (1955). — Drawert, H.: Beiträge zur Stimulation des Pflanzenwachstums. II. Mitteilung. Der Einfluß von Heteroauxin auf die Samenkeimung. Planta (Berl.) **37**, 1—5 (1949). — Fitting, H.: Über die Umkehrung der Polarität in den Sporenkeimlingen einiger Laubmoose. Planta (Berl.) **37**, 635—675 (1950). — Galston, A. W.: Phototropism. II. Bot. Rev. **16**, 361—378 (1950). — Goebel, K.: Über die Jugendzustände der Pflanzen. Flora (Marburg) **72**, 1—45 (1889). — Hämmerling, J.: Über formbildende Substanzen bei Acetabularia mediterranea, ihre räumliche und zeitliche Verteilung und ihre Herkunft. Roux' Arch. **131**, 1—81 (1934). — Heitz, E.: Die Polarität keimender Moossporen. Verh. Schweiz. Naturforsch. Ges., Locarno, S. 168, 1940. — Klebs, G.: Über den Einfluß des Lichtes auf die Fortpflanzung der Gewächse. Biol. Zbl. **13**, 641—656 (1893). — Zur Entwicklungsphysiologie der Farnprothallien. Teil I. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., Abt. B **7**B (1916). — Zur Entwicklungsphysiologie der Farnprothallien. Teil II und III. Sitzgsber. Heidelberg. Akad. Wiss., Math.-naturwiss. Kl., Abt. B **8**B (1917). — Kohlrausch, F.: Lehrbuch der praktischen Physik, 18. Aufl. Leipzig 1943. — Kühn, A.: Vorlesungen über Entwicklungsphysiologie. Heidelberg 1955. — Laage, A.: Bedingungen der Keimung von Farn- und Moossporen. Beih. bot. Cbl. **21**, 76—115 (1907). — Lange, S.: Über den Einfluß weißen und roten Lichtes auf die Entwicklung des Mesokotyls bei Haferkeimlingen. Jb. Bot. **71**, 1—25 (1929). — Linsbauer, K.: Über Regeneration der Farnprothallien und die Frage der „Teilungsstoffe". Biol. Zbl. **46**, 80—96 (1926). — Meyer, D. E.: Über das Verhalten einzelner isolierter Prothalliumzellen und dessen Bedeutung für Korrelation und Regeneration. Planta (Berl.) **41**, 642—645 (1953). — Mohr, H.: Die Beeinflussung der Keimung von Farnsporen durch Licht und andere Faktoren. Planta (Berl.) **1956** (im Druck). — Müller-Stoll, W. R.: Über Regeneration und Polarität bei Enteromorpha. Flora (Jena) **139**, 148—180 (1952). — Nagai, I.: Physiologische Untersuchungen über Farnprothallien. Flora (Jena) **106**, 281—330 (1914). — Nienburg, W.: Die Wirkung des Lichtes auf die Keimung der Equisetumspore. Ber. dtsch. bot. Ges. **42**, 95—99 (1924). — Orth, R.: Zur Keimungsphysiologie der Farnsporen in verschiedenen Spektral-

bereichen. Jb. Bot. **84**, 358—426 (1937). — PARKER, W. M., S. B. HENDRICKS, H. A. BORTHWICK and F. W. WENT: Spectral sensitivities for leaf and stem growth of etiolated pea seedlings and their similarity to action spectra for photoperiodism. Amer. J. Bot. **36**, 194—204 (1949). — RESÜHR, B.: Beiträge zur Lichtkeimung von Amaranthus caudatus L. und Phacelia tanacetifolia Benth. Planta (Berl.) **30**, 471—506 (1939). — REUTER, L.: A contribution to the cell-physiologic analysis of growth and morphogenesis in Fern-prothallia. Protoplasma (Wien) **42**, 1—29 (1953). — RITTER, G.: Über Kugelhefe und Riesenzellen bei einigen Mucoraceen. Ber. dtsch. bot. Ges. **25**, 255—266 (1907). — SCHOSTAKOWITSCH, W.: Über die Reproduktions- und Regenerationserscheinungen bei den Lebermoosen. Flora (Marburg) **79**, Erg.-Bd. 350—384 (1894.) — SEIDEL, F.: Entwicklungsphysiologie der Tiere. Berlin 1953. — STEPHAN, J.: Untersuchungen über die Lichtwirkung bestimmter Spektralbezirke und bekannter Strahlungsintensitäten auf die Keimung und das Wachstum einiger Farne und Moose. Planta (Berl.) **5**, 381—443 (1928). — STOLWIJK, J. A. J.: Antagonistic effects of supplementary light of various wave length regions. 8. Congrès int. de Bot., Sect. 11, S. 320—321. Paris 1954. — URSPRUNG, A.: Über die Bedeutung der Wellenlänge für die Stärkebildung. Ber. dtsch. bot. Ges. **36**, 86—100 (1918). — VÖCHTING, H.: Über Regeneration und Polarität bei höheren Pflanzen. Bot. Ztg **64**, 101—148 (1906). — WASSINK, E. C.: On plants grown exclusively in light of restricted spectral regions. 8. Congrès int. de Bot., Sect. 11, S. 316—318. Paris 1954. — WENT, F. W.: Effects of light on stem and leaf growth. Amer. J. Bot. **28**, 83—95 (1941). — WETTSTEIN, D. v.: Beeinflussung der Polarität und undifferenzierte Gewebebildung aus Moossporen. Z. Bot. **41**, 199—226 (1953). — YAMASAKI, N.: Über den Einfluß von Colchizin auf Farnpflanzen I. Cytologia **19**, 249—254 (1954). — YOSHIMURA, F.: Spherical cell formation in Aspergillus oryzae with special reference to heavy metal impurities in culture solution. J. Fac. Sci. Hokkaido Imp. Univ., Ser. V **3**, 89—99 (1934).

H. MOHR, Tübingen, Botan. Inst. d. Univ.

Planta, Bd. 47, S. 159—164 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Technischen Hochschule Braunschweig

ÜBER DIE BEZIEHUNGEN ZWISCHEN DER LÄNGE VON HAFERKOLEOPTILEN UND DER WACHSTUMSGESCHWINDIGKEIT IHRER ISOLIERTEN AUSSCHNITTE

Von

DIETHARD KÖHLER

Mit 6 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Februar 1956)

Die Wachstumsgeschwindigkeit isolierter Haferkoleoptilzylinder ist eine Funktion der Wuchsstoffkonzentration. Sie entspricht nach BONNER und Mitarbeitern über weite Konzentrationsbereiche der Reaktionsgeschwindigkeit eines Enzyms in Abhängigkeit vom Substrat. Folgerungen aus dieser Übereinstimmung sind nur dann verläßlich, wenn die Wachstumsgeschwindigkeit der Zylinder in einer bestimmten Wuchsstoffkonzentration über längere Zeit konstant bleibt. Eine solche Konstanz fanden BENNET-CLARK und KEFFORD (1954) nicht; sie stellten vielmehr fest, daß die Wachstumsgeschwindigkeit im Laufe des Versuchs gesetzmäßigen Schwankungen unterliegt. In einer späteren Arbeit zeigen dagegen BONNER und FOSTER (1955), daß die Wachstumsgeschwindigkeit auch bei Messung in kurzen Intervallen konstant ist. Sie sprechen die Vermutung aus, daß die gegensätzlichen Resultate auf Unterschieden in der Methodik beruhen. BENNET-CLARK und KEFFORD verwendeten kürzere Koleoptilen und ungepufferte Wachstumslösungen ohne K-Ionen. Im folgenden soll gezeigt werden, welche von den drei genannten Bedingungen die Inkonstanz der Wachstumsgeschwindigkeit hervorruft.

Methodik. Die Versuche wurden in einer Klimakammer bei 26° C und Rotlicht (Schott-Filter RG 1) mit Hafer der Sorte Goldkorn (Pommersche Saatzucht) durchgeführt. Die nichtentspelzten Haferkörner wurden in Petrischalen auf Filtrierpapier angequollen und nach 24 Std mit der Kornbasis nach unten in feuchten Sand gesteckt. Nach weiteren 40 bis 48 Std hatten die am weitesten entwickelten Koleoptilen die gewünschte Länge (Messung von der Kornbasis ab) erreicht. 10 bis 12 Koleoptilen gleicher Länge wurden dann gleichzeitig so geschnitten, daß die entstehenden Zylinder genau den Abschnitt von 3 bis 8 mm unter der Spitze umfaßten. Der Primärblattrest wurde entfernt und die Zylinder auf einer Glaskapillare aufgereiht. Diese wurde dann in den einen Schenkel eines U-förmig gebogenen Glasrohres gestellt. In diesen tropfte mit konstanter Geschwindigkeit die Versuchslösung, nachdem sie vorher zur Versorgung mit Luftsauerstoff

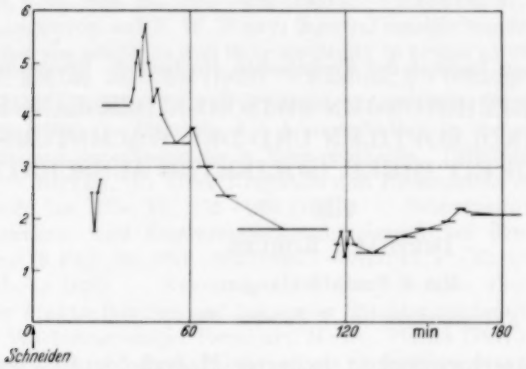

Abb. 1. (Unterschrift zu Abb. 1—3 s. S. 161)

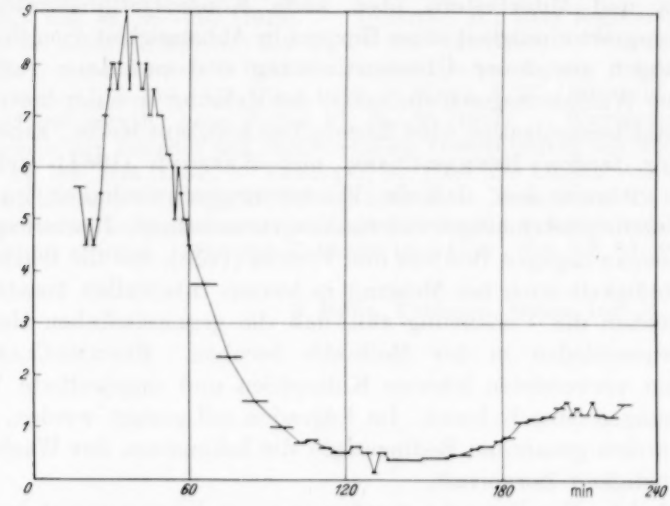

Abb. 2

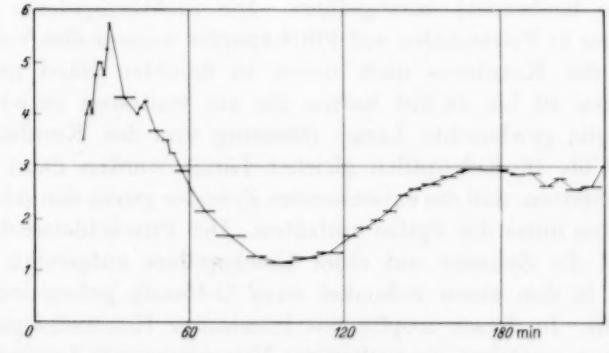

Abb. 3

über eine Filtrierpapierbrücke gelaufen war. Die an den Zylindern vorbeigeströmte Lösung floß aus dem anderen Schenkel des U-Rohrs ab. Das Horizontalmikroskop wurde auf die obere Schnittfläche des obersten Zylinders eingestellt und der Zuwachs der gesamten Zylinderreihe in Abständen von einer bis einigen Minuten mit dem Okularmikrometer verfolgt. Der Ablesefehler war kleiner als ein halber Teilstrich. Da die Streuung der Zuwachswerte der einzelnen Zylinder bei der gewählten Versuchsanordnung nicht festgestellt werden konnte, wurden alle Versuche mehrfach wiederholt. Die Ergebnisse sind graphisch dargestellt, auf der Ordinate der Zuwachs der gesamten Zylinderreihe in Teilstrichen je Minute, auf der Abszisse die Zeit nach dem Schneiden der Koleoptilen in Minuten.

Ergebnisse. Die Abb. 1 zeigt den Wachstumsverlauf von Zylindern aus 21 mm langen Koleoptilen in m/75 KH_2PO_4 (p_H 4,5). Die Wachstumsgeschwindigkeit steigt anfänglich an, wahrscheinlich auf Grund einer Einstellung auf die osmotischen Verhältnisse der Lösung, und fällt dann wegen Verbrauchs der Wuchsstoffreserven bis zum Ende der zweiten Stunde nach dem Schneiden wieder ab. Der darauffolgende Anstieg ist der Tätigkeit der neugebildeten physiologischen Spitze zuzuschreiben. Bei Zylindern aus 25 mm langen Koleoptilen ist dieser Anstieg merklich verzögert (Abb. 2), er erreicht auch nicht die gleiche Höhe wie bei den Zylindern aus kleineren Koleoptilen. Behandelt man jedoch solche Zylinder mit Tryptophan (Abb. 3 für 26 mm-Zylinder), so ist der Anstieg sogar erheblich stärker als bei den Zylindern aus viel kleineren Koleoptilen ohne Tryptophan (vgl. Abb. 1). Daraus ist zu folgern, daß die etwa 2 Std nach dem Schneiden neu gebildete physiologische Spitze wahrscheinlich nichts anderes ist als ein Enzymsystem zur Bildung von Indolessigsäure aus Tryptophan, und weiterhin, daß der geringere Wachstumsanstieg nach der zweiten Stunde bei Zylindern aus längeren Koleoptilen auf einem stärkeren Mangel an Substrat für die Wuchsstoffproduktion beruht.

Die Koleoptilzylinder wuchsen in allen 3 Versuchen in KH_2PO_4, der p_H-Wert der Lösung entspricht also dem von Bonner und Foster verwendeten, die keine Schwankungen in der Wachstumsgeschwindigkeit finden konnten. Damit sind die beiden Faktoren

Abb. 1—3. Wachstum isolierter Koleoptilen-Abschnitte. Abszisse: Zeit nach dem Schneiden in Minuten. Ordinate: Zuwachs einer Abschnittsreihe in Teilstrichen je Minute. Versuchsdaten

Abbildungen	Koleoptillänge mm	Stoffe in der Versuchslösung
1	21	KH_2PO_4 m/75
2	25	KH_2PO_4 m/75
3	26	KH_2PO_4 m/75 Tryptophan $4 \cdot 10^{-5}$

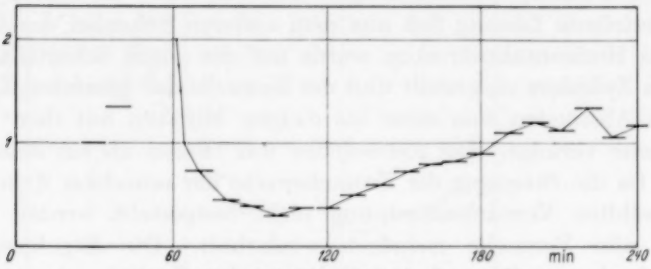

Abb. 4. (Unterschrift zu Abb. 4—6 s. S. 163)

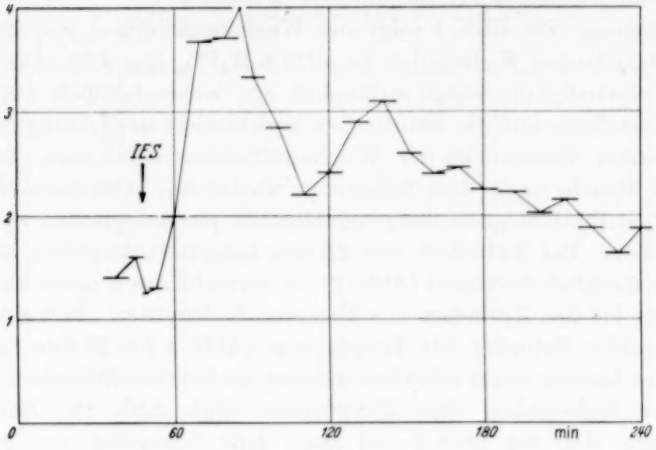

Abb. 5

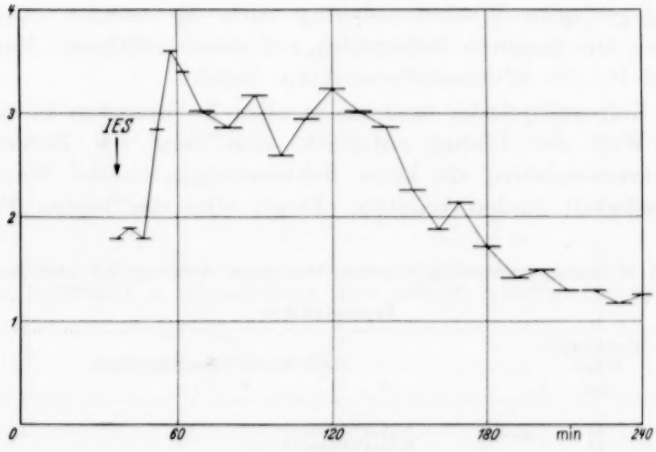

Abb. 6

p_H-Wert und Mangel an K-Ionen als Ursachen der Inkonstanz des Wachstums ausgeschaltet. Offenbar bestimmt die Länge der Koleoptilen die Stärke des Wachstums der Zylinder nach der Wiederbildung der physiologischen Spitze: die Inkonstanz des Zuwachses beruht auf der Verwendung von Abschnitten aus 15 bis 20 mm langen Koleoptilen (Bennet-Clark), die Konstanz bei Bonner und Foster erklärt sich aus der Verwendung 30 mm langer Koleoptilen.

Daß der p_H-Wert keine grundsätzliche Rolle bei der Wiederbildung der physiologischen Spitze spielt, kann außerdem aus der Abb. 4 abgelesen werden. Es handelt sich um Zylinder aus 20 mm langen Koleoptilen in m/150 KH_2PO_4 + m/150 Na_2HPO_4 (p_H 6,8). Gegenüber den Versuchen bei p_H 4 ist lediglich die allgemeine Wachstumsgeschwindigkeit geringer (der Ordinatenmaßstab ist hier vergrößert!). Gibt man solchen Zylindern Indolessigsäure (Abb. 5), so steigt die Wachstumsgeschwindigkeit an. Das Maximum tritt 30 min nach IES-Zugabe ein; ihm folgt ein Abfall bis zum Minimum, das kurz vor Ende der zweiten Stunde liegt, also zum gleichen Zeitpunkt wie bei der Kontrolle. Daran schließt sich der durch die Eigenbildung von Wuchsstoff verursachte Anstieg bis zu einem Punkt (etwa 140 min nach dem Schneiden), von dem ab die Wachstumskurve spiegelbildlich zur Kontrolle verläuft. Von hier ab ist offenbar die Summe zugegebener + eigener Wuchsstoff überoptimal. Die stetige Zunahme des eigenen Wuchsstoffes äußert sich in einer immer stärker werdenden Wachstumshemmung. Die Lage des Umschlagspunktes ist abhängig von der Menge des von außen gegebenen Wuchsstoffes; er liegt bei der höheren Konzentration von Indolessigsäure früher (Abb. 6). Das Wachstumsminimum vor Ende der zweiten Stunde ist auch nicht so ausgeprägt wie bei niedrigerer Konzentration. Eine IES-Konzentration, die zu dieser Zeit maximales Wachstum bewirkt, müßte bei Beginn der Eigenproduktion sofort überoptimal werden, die Wachstumsgeschwindigkeit also sofort abnehmen.

Aus den beschriebenen Versuchen ergibt sich folgendes: Eine konstante Wachstumsrate von Koleoptilzylindern in einer bestimmten Wuchsstoffkonzentration kann nur erwartet werden, wenn die Eigenproduktion an Wuchsstoff sehr schwach oder gleich Null ist. Dies

Abb. 4—6. Wachstum isolierter Koleoptilen-Abschnitte. Abszisse: Zeit nach dem Schneiden in Minuten. Ordinate: Zuwachs einer Abschnittsreihe in Teilstrichen je Minute. Versuchsdaten

Abbildungen	Koleoptillänge mm	Stoffe in der Versuchslösung
4	20	KH_2PO_4 m/150 Na_2HPO_4 m/150
5	20	KH_2PO_4 m/150 Na_2HPO_4 m/150 Indolessigsäure $3{,}6 \cdot 10^{-6}$
6	20	KH_2PO_4 m/150 Na_2HPO_4 m/150 Indolessigsäure $1{,}3 \cdot 10^{-5}$

trifft nicht zu bei den kurzen Koleoptilen, mit denen BENNET-CLARK und KEFFORD gearbeitet haben, wohl aber bei den von BONNER benutzten längeren Koleoptilen, deren Zylinder ohne Wuchsstoffzugabe mit einer sehr geringen, einigermaßen konstanten Geschwindigkeit wachsen. Kleine Abweichungen der Wachstumsgeschwindigkeit über längere Zeiten und stärkere Abweichungen in kurzen Zeiträumen sind bei der bisher verwendeten Methode und dem Verfahren, nicht das Wachstum in der Zeiteinheit, sondern den Gesamtzuwachs graphisch aufzutragen, nicht zu erkennen. Daher konnten BONNER und FOSTER auch den hier gezeigten Anstieg der Wachstumsgeschwindigkeit nach Zugabe von IES nicht feststellen.

Zusammenfassung

Die Wachstumsgeschwindigkeit von Koleoptilzylindern ist eine Funktion der Summe von selbstgebildetem und zugegebenem Wuchsstoff. Schwankt die Eigenbildung von Wuchsstoff und ist seine Menge gegen die Menge des von der Versuchslösung aufgenommenen Wuchsstoffs nicht zu vernachlässigen, dann resultiert daraus eine schwankende Wachstumsgeschwindigkeit. Je kleiner die Koleoptilen sind, desto mehr Wuchsstoff produzieren die aus ihnen geschnittenen Zylinder nach der Wiederbildung der physiologischen Spitze, desto schwankender ist also ihr Wachstum. Zylinder aus längeren Koleoptilen bilden kaum noch eigenen Wuchsstoff, weil sie Mangel an Wuchsstoffvorstufe (Tryptophan) haben. Ihr eigener Wuchsstoff kann gegenüber dem aufgenommenen Wuchsstoff vernachlässigt werden; das Wachstum solcher Abschnitte ist daher nahezu konstant.

Literatur

BENNET-CLARK, T. A., and N. P. KEFFORD: J. of exper. Bot. **5**, 293—304 (1954). — BONNER, J., and R. J. FOSTER: J. of exper. Bot. **6**, 293—302 (1955).

Dr. DIETHARD KÖHLER, Braunschweig, Humboldtstr. 1, Botan. Institut

Planta, Bd. 47, S. 165—218 (1956)

Aus dem Botanischen Institut der Tierärztlichen Hochschule Hannover

NACHWEIS VON ADENOSINTRIPHOSPHORSÄURE (ATP) IN GRÜNALGEN UND HELODEA SOWIE EINBAU VON RADIOAKTIVEM PHOSPHOR (^{32}P) BEI DER PHOTOSYNTHESE

Von

LOTTE SCHWINCK

Mit 20 Textabbildungen

(Eingegangen am 7. Oktober 1955)

Einleitung

Eine Reihe von Photosynthesearbeiten der letzten Jahre befaßte sich mit der von RUBEN (1943) und von EMERSON, STAUFFER und UMBREIT (1944) aufgeworfenen Frage einer Übertragung eines Teiles der photochemisch gewonnenen Energie auf energiereiche Phosphatverbindungen. Die Arbeitsgruppen von BENSON und CALVIN sowie FAGER und GAFFRON fanden bei Photosyntheseversuchen mit kurzfristiger $^{14}CO_2$-Einlagerung eine große Anzahl von Phosphatverbindungen mit ^{14}C markiert. Auffallend war dabei, daß Zuckerphosphatester und insbesondere Phosphoglycerinsäure den schnellsten Aktivitätsanstieg zeigten, was für einen Syntheseweg des fixierten $^{14}CO_2$ über diese Verbindungen spricht. KANDLER (1950) erfaßte bei *Chlorella* eindeutige Schwankungen im anorganischen Orthophosphatgehalt innerhalb der ersten 90 Sekunden nach Licht- und Dunkelwechsel. Andere Autoren (ARONOFF und CALVIN 1948, GEST und KAMEN 1948, WASSINK und Mitarb. 1951 u. 1952, SIMONIS und GRUBE 1952 u. 1953, GRUBE 1953 u. a.) verfolgten Schwankungen im Phosphatspiegel der in Trichloressigsäure (TES) löslichen und unlöslichen Fraktion unter verschiedenen Photosynthesebedingungen. Veränderte Photosynthese unter Einwirkung verschiedener, spezifischer Hemmstoffe (HOLZER 1951) läßt sich durch Ausfall der zur Photosynthese notwendigen Phosphorylierungsschritte deuten. Nach Versuchen von PIRSON, TICHY und WILHELMI 1952 und LINDEMANN 1951 zeigt die Photosynthese phosphatverarmter Zellen im Starklicht einen Anstieg, sobald wieder Phosphat geboten wird. All diese Untersuchungen lassen eine Beteiligung von Phosphorylierungsvorgängen an der Photosynthese heute als gesichert erscheinen.

Die zentrale Bedeutung des Adenylsäuresystems für den Kohlenhydratabbau und im intermediären Stoffwechsel legt die Frage nahe, ob es sich bei dem an der Photosynthese beteiligten energiereichen Phosphat

ebenfalls um ATP handelt und — wenn ja — wieweit ATP an der Photosynthese beteiligt ist. Versuche im hiesigen Institut (SIMONIS und GRUBE 1952, GRUBE 1953) zeigten nun unter verschiedenen Photosynthesebedingungen stärkere Schwankungen des organischen Phosphates der TES-löslichen Fraktion. Als energiereiche Phosphatverbindung der TES-löslichen Fraktion kommt besonders das Adenylsäuresystem in Frage; es schien deshalb wünschenswert, diese Fraktion weiter zu analysieren.

Bei Beginn dieser Untersuchungen im Sommer 1951 war ATP nur in tierischen Geweben, Bakterien, Hefen, Pilzen und noch nicht in grünen, zur Photosynthese befähigten Pflanzen oder Pflanzenorganen nachgewiesen worden. ALBAUM, OGUR und HIRSHFELD hatten 1950 in keimenden *Phaseolus aureus* bei sehr großen Ausgangsmengen erstmalig eine ATP-ähnliche Verbindung gefunden. Nach mehreren Reinigungsschritten gelang ihnen dann die Isolierung einer mit der tierischen ATP identischen Substanz. Die Befunde an *Euglena* (ALBAUM, SCHATZ, HUTNER und HIRSHFELD 1950) haben für unsere Fragestellung keine Bedeutung, da es sich um einen auch zur Heterotrophie befähigten Organismus handelt, der außerdem eine von allen anderen bisher untersuchten Organismen völlig abweichende CO_2-Assimilation im Dunkeln zeigt (LYNCH und CALVIN 1954).

Es fehlte also immer noch der ATP-Nachweis in der photosynthetisierenden Pflanze. So war die erste Aufgabe dieser Untersuchungen, aus grünen Pflanzenteilen ATP zu isolieren und als solche zu identifizieren. Nach dem Ausbau eines quantitativen Testes sollte dann die Einlagerung von ^{32}P in das Adenylsäuresystem bei Licht und Dunkelheit verfolgt werden.

Herrn Prof. Dr. W. SIMONIS möchte ich für die Anregung zu dieser Arbeit und die rege Anteilnahme herzlich danken. Für die Bereitstellung von Materialien und Geräten sind wir der Deutschen Forschungsgemeinschaft zu Dank verpflichtet.

Material und Methode

1. Pflanzenmaterial

a) Algen

Verwendet wurde ein Stamm der einzelligen Grünalge *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Brunnthaler, der dem Institut schon vor einiger Zeit freundlicherweise von Herrn Professor PIRSON, Marburg, überlassen wurde. Die *Ankistrodesmen* wurden gegenüber *Chlorella* und anderen *Chlorococcales* wegen ihrer relativ schnellen und großen Massenentwicklung bevorzugt. Als Anzuchtflaschen dienten große Gaswaschflaschen (Abb. 1a) von 1000 ml Inhalt. Der Außenluft wurde aus einer CO_2-Bombe etwa 3 Vol.-% CO_2 beigemischt. Ein dichtes Wattefilter und Intensivwaschflaschen mit 2% Sublimat- und 6% $CuSO_4$-Lösung sorgten für eine weitgehende Entkeimung der Luft. Die Algenkultur befand sich in der Nähe eines Fensters in einem temperaturkonstant gehaltenen Laboratorium (20° C). Außer

dem Tageslicht waren die Algen Tag und Nacht dem Zusatzlicht von zwei Philips Leuchtstoffröhren (T 1—40 W — 33 weiß) und zwei 40 Watt-Glühlampen ausgesetzt.

Als Nährlösung wurde die von KANDLER (1950) angegebene verwendet: 0,4 g KNO_3; 0,1 g $KH_2PO_4 \cdot H_2O$; 0,1 g $MgSO_4 \cdot 7\,H_2O$; 0,1 g $Ca(NO_3)_2 \cdot 4\,H_2O$; 0,1 g KCl; Spur $Fe_2(SO_4)_3$; 1 ml AZ-Lösung nach Hoagland ad 1000 ml aqua dest. Zum Animpfen dienten Reinkulturen auf Nährsalzagar bzw. $MgSO_4$-Gelatine. Später wurde z. T. auch mit mehreren ml einer dicken Algensuspension konzentrierter angeimpft. Ständige mikroskopische Kontrollen vor der Ernte und vor dem Neuanimpfen sorgten für die Reinerhaltung der Massenkulturen. Für die Versuche wurden nur Suspensionen mit geringstem Bakteriengehalt (allerhöchstens 0,2%) verwendet. Um besonders große Algenmassen zu gewinnen, war es nötig, je nach Dichte der Algensuspension die Nährlösung nach 5 bis 10 Tagen zu erneuern. Die schließlich erreichte Algenkonzentration brachte Ernten von 1 g Algenfrischgewicht in etwa 200 ml. Trotz der das ganze Jahr über konstanten Raumtemperatur und der gleichmäßigen künstlichen Zusatzbeleuchtung war stets im Frühjahr und im Frühsommer ein schnelleres Wachstum zu beobachten.

Außer *Ankistrodesmus* wurde in einigen Versuchen auch *Chlorella pyrenoidosa* verwendet. Die Anzucht erfolgte wie bei *Ankistrodesmus*.

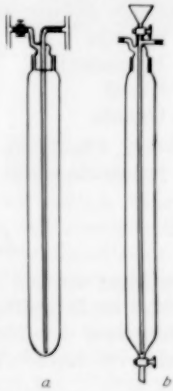

Abb. 1 a u. b. a Algenkulturflasche, b Gaswaschflasche für die Algensuspension, wie sie zur ^{32}P-Einlagerung verwendet wurde

b) Höhere Pflanzen

Neben Algen wurden Blätter der Wasserpest (*Helodea densa*), von Spinat (*Spinacia oleracea* L.) und Stiefmütterchen (*Viola tricolor* L. — Hybriden) auf ihren ATP-Gehalt untersucht. Pflanzen von *Helodea densa* bezogen wir von der Firma W. Harster, Speyer. Über ihre Kultivierung in unserem Institut vgl. GRUBE (1953). Bei Spinat und Stiefmütterchen wurden einer Freilandkultur je Pflanze zwei bis drei junge, eben frisch entfaltete Blätter entnommen. Nach mehrmaligem Waschen in Leitungswasser und aqua dest. kamen die Blätter sofort in voll turgeszentem, frischem Zustand zur Aufbereitung.

2. *Vergleichsmaterial*

Für Modellversuche und als authentische Vergleichssubstanzen bei der papierchromatographischen Trennung wurden die folgenden Handelspräparate benutzt. (Später für die Präparate verwendete Abkürzungen in Klammern.)

Zellstoffabrik Waldhof, Wiesbaden, pharmazeutische Abteilung, später bezogen über „Bayer"
- Adenosintriphosphat, Na-Salz . . . . . (ATP)

„Bayer" Leverkusen, Sero-Bakteriologische Abteilung
- Adenosin-3-phosphorsäure (Hefeadenylsäure) . . . . (A_3MP)
- Adenosin-5-phosphorsäure (Muskeladenylsäure) . . . (A_5MP)
- Adenosin . . . . . (Adno)
- Adenin . . . . . (Ad)
- d-Ribose . . . . .

Schwarz Laboratories Inc., New York
- Adenosindiphosphat, Ba-Salz . . . . . (ADP)
- Glucose-1-phosphat, K-Salz . . . . . (Gl-1-P)
- Glucose-6-phosphat, Ba-Salz . . . . . (Gl-6-P)
- Fructose-6-phosphat, Ba-Salz . . . . . (Fr-6-P)
- Fructose-1,6-diphosphat, Ba-Salz . . . . . (Fr-1,6-P)
- Phosphoglycerinsäure, Ba-Salz . . . . . (PGS)
- Diphosphopyridinnucleotid (Co-Zymase I) . . . . . (DPN)

Merck, Darmstadt
- Pyrophosphat, Na-Salz . . . . . (Pyro-P)
- Metaphosphat, Na-Salz . . . . . (Meta-P)

Dr. Theodor Schuchardt, München
- Thymin
- Hypoxanthin
- Uracil
- Guanin

Fluka A.G., Chem. Fabrik St. Gallen
- Ribose-5-phosphat, Ba-Salz . . . . . (Ri-5-P)

3. Herstellung der Pflanzenextrakte

Die Algen wurden durch Zentrifugieren von der Nährlösung getrennt und anschließend im Zentrifugenglas mit aqua dest. gewaschen. Über Verarmung und Vorbehandlung der Algen vor einer ^{32}P-Einlagerung s. S. 196. Extrahiert wurde mit kalter (5 bis 8° C) 10% Trichloressigsäure (TES) oder 83% Aethanol, und zwar mit 85 bis 120% der Algenfrischgewichtmenge je nach Weiterverwendung. Die Extraktionsgefäße standen stets im Kühlschrank bei etwa 5 bis 7° C.

Tabelle 1. *Phosphatgehalt aufeinanderfolgender Extrakte. Extraktionsmittel 10% TES, Extraktionsdauer jeweils 30 Min.*

	Versuch-Nr.			
	I	II	III	
1. Extrakt	123,6	161,0	188,0	$\gamma^{31}PO_4$/ml Extrakt
2. Extrakt	48,5	50,5	72,0	$\gamma^{31}PO_4$/ml Extrakt
3. Extrakt	38,5	34,0	—	$\gamma^{31}PO_4$/ml Extrakt
4. Extrakt	22,5	51,0	—	$\gamma^{31}PO_4$/ml Extrakt
5. Extrakt	26,5	—	—	$\gamma^{31}PO_4$/ml Extrakt

Bei *TES* wurde mehrmals hintereinander mit frischer TES je 60 Min., in einigen Fällen 30 Min., extrahiert. Den Gehalt der aufeinanderfolgenden TES-Extrakte an $^{31}PO_4$ zeigt die Tabelle 1. Auch im 4. und 5. Extrakt finden sich noch beträchtliche Mengen Phosphat. Da zunächst die qualitative Seite der Frage bearbeitet wurde (über quantitative ^{32}P-Bestimmungen s. später S. 173), so wurden, um den Extrakt nicht unnötig zu verdünnen, diese letzten Extrakte verworfen. Von einer nachträglichen Einengung wurde wegen der gleichzeitigen Konzentrierung der TES und der Labilität der ATP abgesehen. Tabelle 1 zeigt deutlich den Hauptanteil des Phosphates im 1. Extrakt. Bei den Fermentversuchen wurden die drei ersten TES-Extrakte vereinigt, zur Papierchromatographie später stets nur noch der 1. TES-Extrakt verwendet.

Bei *Alkohol*extrakten findet sich prozentual bereits ein größerer Anteil der ATP im 1. Extrakt (s. S. 198). Außerdem konnte der 83% Alkoholextrakt durch einfaches Verdampfen des Alkoholanteiles oder durch Destillation im schwachen Vakuum sehr viel leichter und schonender eingeengt werden. Zum qualitativen

Nachweis wurde nur der 1. Alkoholextrakt verwendet; die Extraktionsdauer betrug 3 Stunden im Kühlschrank bei 5 bis 7° C. In Kontrollversuchen wurde außerdem die Extraktionsdauer bis zu maximal 24 Stunden variiert.

Extrakte von *Helodea*-Blättern wurden ebenfalls mit 10% TES oder 83% Aethanol gewonnen. In gleicher Weise wie die *Helodea*-Blätter wurden auch gesäuberte Blätter von Spinat und Stiefmütterchen mit 83% Aethanol im Kalten extrahiert. Über Homogenisate von frischem Spinat- und Stiefmütterchen-Material wird auf S. 195 berichtet.

4. Hydrolytische und fermentative Spaltung

In einer Reihe von Versuchen wurde der $^{31}PO_4$-Spiegel von ATP-Lösungen vor und nach hydrolytischer oder fermentativer Spaltung verfolgt und authentische ATP mit Pflanzenextrakten in ihrem Verhalten verglichen.

a) Phosphatbestimmung

Zur quantitativen Bestimmung des anorganischen Phosphates wurde die Molybdän-Blau-Reaktion nach Martland und Robison (1926) benutzt.

Um den Fehler einer zeitabhängigen Farbvertiefung bei meinen Messungen weitmöglichst auszuschalten, wurde die Reduktionslösung zu den einzelnen Proben in genau 5 Min.-Abstand zugesetzt und dann nach jeweils konstant 30 oder 60 Minuten dieser 5 Min.-Abstand bei der Ablesung am Pulfrich-Photometer in gleicher Reihenfolge eingehalten. Andere Fehlerquellen dieser Methode liegen erstens in der Art der in der Probe vorliegenden Säureionen und zweitens in der Konzentration dieser Säuren. Befindet sich z. B. TES in den Proben, so bewirkt diese eine schnellere und intensivere Farbvertiefung gegenüber Ansätzen mit Wasser und nur H_2SO_4, obwohl gleicher p_H-Wert vorliegt. Ferner führt weniger Säure zu stärkerer, mehr Säure zu schwächerer Farbtiefe. Da es hier das anorganische Phosphat in TES-Extrakten zu bestimmen galt, wurde stets in allen Meßkolben eine konstante TES-Menge eingehalten. Ebenso wurde mit der HCl-Konzentration verfahren. Bei den Eichkurven wurde also Zeitabhängigkeit, Säureart und Säurekonzentration berücksichtigt und in den Proben später entsprechend konstant gehalten.

b) Säure-Hydrolyse

Um das labile Phosphat der ATP, das sogenannte „7 Minuten-Hydrolyse-Phosphat" zu bestimmen, wurde nach Lohmann hydrolysiert (7 Min., 1 n HCl, 100° C). Außerdem wurde die Hydrolysezeit von 7 Minuten variiert, und zwar auf 0, 4, 7, 10, 15 und 60 Minuten, um vergleichend einerseits bei authentischer ATP und andererseits bei Pflanzenextrakt die entstehenden Spaltprodukte der ATP papierchromatographisch zu verfolgen. Dabei bedeutet 0 Minuten: nicht im Wasserbad erhitzt, aber Zusatz von HCl wie in den anderen Proben mit längerer Hydrolysezeit. Als Kontrolle diente stets authentische ATP und Pflanzenextrakt derselben Ausgangslösung ohne HCl Zusatz.

Da mir zu Beginn meiner Arbeit als authentische Vergleichssubstanz nur ATP und nicht ADP zur Verfügung stand, wandte ich zur Gewinnung von ADP die Methode der Hydrolyse nach Bielschowsky (1950) an (60 Min., p_H 4,5, 100° C). Diese ADP-Hydrolyse wurde ebenfalls vergleichend für ATP und Pflanzenextrakt durchgeführt und die hydrolysierten Proben sowie die Kontrollen anschließend papierchromatographisch getrennt.

Später wurden auch authentische ADP, A_3MP, A_5MP und Adenosin der 7 Minuten-Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° C unterworfen.

c) Herstellung der Apyrase

Die Apyrase wurde nach der Methode von KALCKAR (1947) nach KRISHNAN (1949) aus Kartoffeln gewonnen. Zur Aktivierung der Apyrase wurde dem Reaktionsgemisch stets $CaCl_2$ zugesetzt. Einzelheiten des Enzymansatzes werden im experimentellen Teil (s. S. 176) besprochen.

5. Papierchromatographie

Chromatographiert wurde auf- und absteigend sowie ein- und auch zweidimensional. Da die Phosphatester, besonders ATP, in vielen Lösungsmitteln nur einen sehr geringen R_f-Wert haben, wurde in den meisten Fällen mit Durch-

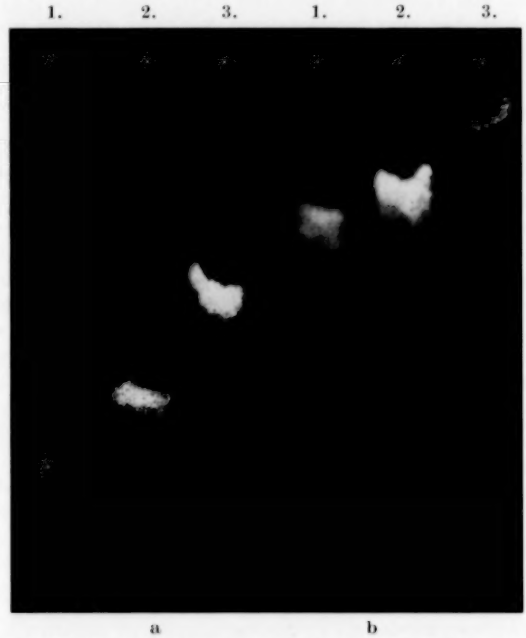

Abb. 2. Einfluß der Papierqualität auf den R_f-Wert. Vergleich von drei verschiedenen Sendungen von Whatman I (1. 2. 3.). a Authentische A_5MP, b authentische ATP; Butanol-Essigsäure, absteigend, 49 Stdn. × Startfleck, gilt für alle Abbildungen von Papierchromatogrammen

laufchromatogrammen gearbeitet. Zur Erreichung größerer R_f-Werte erwies es sich ferner bei einigen Lösungsmitteln als günstig, das Chromatogramm, nachdem die Frontlinie das Papier durchlaufen hat, zu trocknen und in gleicher Richtung mit gleichem Lösungsmittel noch einmal zu starten. Eine gesamte Laufzeit von 36 plus 20 Stunden ergibt einen größeren R_f-Wert als 56 Stunden durchgehend.

Als Chromatographiekästen dienten Glaskästen mit Glasdeckel, in denen alle gelackten oder gekitteten Ritzen paraffiniert waren. Das Lösungsmittel befand sich in Porzellan- oder V_2A-Stahlwannen. Es wurden Bögen (46 × 57 cm) von Whatman I benutzt (keine Vorbehandlung); die Startflecken lagen in 5 cm Abstand voneinander. Der vielfach übliche Startfleckabstand von ca. 3 cm hatte sich in Vorversuchen bei Durchlaufchromatogrammen als ungünstiger erwiesen. Aufgetragen wurden die Lösungen auf den Startfleck mit 0,1 ml Meßpipetten

(1:100 geteilt mit Schliffspitze) und mehrfach hintereinander mit einem Föhn (Astron) eingetrocknet.

Leider erwies sich die Papierqualität verschiedener Sendungen von Whatman I als sehr unterschiedlich (Abb. 2). Unter gleichen Bedingungen hergestellte Chromatogramme mit Modellsubstanzen, die gleichzeitig in der gleichen V_2A-Stahlwanne gelaufen waren, zeigten in der einen Papiersendung einen sehr viel größeren R_f-Wert für ATP bzw. A_5MP als in der 2. oder 3. Sendung. Deshalb wurde bei quantitativen Versuchen stets nur Papier von einer Sendung verwendet.

a) Lösungsmittel

Als Lösungsmittel wurden benutzt:

1. eindimensional, Isobuttersäure-Wasser-Eisessig 20:14:0,8 nach TURBA[1]);

2. eindimensional, n Butanol-Eisessig-Wasser, 74:19:50 nach BENSON, BASSHAM, CALVIN, GOODALE, HAAS, STEPKA (1950);

3. zweidimensional, 1. Richtung: Butanol-Eisessig-Wasser (s. unter 2), 2. Richtung: A. Butanol-Wasser 1246:84; B. Propionsäure-Wasser 620:790, A und B 1:1 gemischt nach BENSON und Mitarb. (s. unter 2);

4. eindimensional, Isobuttersäure-Wasser- konz. Ammoniak 66:33:1 nach ZETTERSTRÖM und LJUNGGREN (1951) und zweidimensional auf Isobuttersäure-Wasser-Eisessig (s. unter 1) folgend;

5. eindimensional, Ameisensäure-Aethanol-Wasser 15:80:5;

6. zweidimensional, 1. Richtung: Methanol-Ameisensäure-Wasser 80:15:5; 2. Richtung: Methanol-Ammoniumhydroxyd (0,9015)-Wasser 60:10:30 nach BANDURSKI und AXELROD (1951);

7. eindimensional, Aceton-15% TES 65:35 und Aceton-30% Essigsäure 1:1. Diese und weitere Aceton-Gemische nach BURROWS, GRYLLS, HARRISON (1952) trennten weniger gut.

Überwiegend wurden die Lösungsmittel 1. und 2. benutzt. Die Laufzeiten wurden je nach der Fragestellung sehr verschieden gewählt (für 1. 14 bis 36 Stunden, für 2. 24 bis 60 Stunden).

b) Photoprintverfahren

Die Lage der im UV-Licht bei 260 mμ absorbierenden Substanzen auf dem Papierchromatogramm wurde mit dem Photoprintverfahren von MARKHAM und SMITH nach TURBA und TURBA (1951) festgestellt. Zur Photographie wurde Agfastat-Papier verwendet (Abstand zur Lichtquelle 1,30 m) und nicht, wie vielfach in der Literatur angegeben, Agfa-Copex-Papier. Agfastat-Papier erwies sich als sehr viel empfindlicher; es zeigt Flecken von geringer Konzentration bei viel kürzerer Belichtungszeit besser als Agfa-Copex, hat allerdings den Nachteil, daß bei Rotlicht gearbeitet werden muß, während Agfa-Copex gedämpftes Tageslicht verträgt.

Ein solches „UV-Photo" zeigen die Abb. 2, 4, 5, 6 u. a. Das Photoprintverfahren diente hier nur zur qualitativen Analyse, nicht zu quantitativen Bestimmungen.

c) Phosphatnachweis

Auf dem Chromatogramm wurde Phosphat mit der Molybdän-Blau-Reaktion nach HANES und ISHERWOOD (1949), modifiziert in Anlehnung an BANDURSKI und AXELROD (1951), sichtbar gemacht.

[1] Für die Mitteilung der Zusammensetzung des Isobuttersäuregemisches bin ich Herrn Prof. TURBA, Mainz, zu großem Dank verpflichtet.

Das getrocknete Chromatogramm wurde mit dem HANES- und ISHERWOOD-Sprühreagens (5 ml 60% w/w Perchlorsäure, 25 ml 4% w/v Ammoniumolybdat, 10 ml 1 n HCl ad 100 ml Wasser) besprüht, das anorganische Phosphat wird dabei sehr bald als gelber Fleck sichtbar. Danach wurde das Chromatogramm in einem Trockenschrank bei 85° C 3 bis 4 Minuten getrocknet und sofort im Anschluß daran für 5 bis 7 Minuten der ungefilterten Strahlung einer Quecksilberdampf-Hochdrucklampe ausgesetzt, Abstand etwa 30 bis 40 cm. Dabei wechselt die gelbe Farbe des anorganischen Phosphates ins Blaugrüne, während die organischen Phosphatverbindungen schon nach gut einer Minute als leuchtend blaue Flecken auftreten. So konnten auch kleinste Mengen schwer hydrolysierbarer Phosphatester, wie z. B. die PGS, sichtbar gemacht werden. Das Chromatogramm muß bei Beginn der UV-Bestrahlung noch ganz schwach feucht sein. Zu trockenes Papier gibt keine vollständige Farbreaktion mehr, nur leichter hydrolysierbare oder konzentrierte Flecken werden noch sichtbar, der Hintergrund wird leicht gelb bis braun. Bei zu feuchtem Papier dagegen gibt es nachträglich eine Bläuung des Hintergrundes. Durch Aufhellen im Ammoniakdampf läßt sich diese Bläuung des Hintergrundes zwar wieder entfernen, gleichzeitig verschwinden aber auch die blauen Flecken schwer hydrolysierbarer Phosphatester; nur durch Hydrolyse abgespaltenes anorganisches Phosphat (blaugrüne Flecken) ist resistent gegen die Aufhellung im Ammoniakdampf (s. inzwischen auch FLECKENSTEIN und Mitarb. 1953). Paßt man durch etwas längere oder weniger lange Behandlung bei 85° C den richtigen Feuchtigkeits-Zustand des Chromatogramms ab, so lassen sich mit dieser modifizierten Methode sehr kleine Mengen auch schwer hydrolysierbarer Phosphatester anfärben, während der Hintergrund klar weiß bleibt. Auch nach längerer Zeit — über 48 Stunden — verändert sich das so erhaltene Bild nicht wesentlich.

d) Aminosäurennachweis

Die Chromatogramme wurden mit der bekannten Ninhydrin-Reaktion auf Aminosäuren angefärbt. (Sprühreagens: 0,1% Ninhydrinlösung in halb wassergesättigtem Butanol, danach 5 Min. bei 80° C erhitzt.)

e) Zuckernachweis

Pentosen und Hexosen wurden auf dem Chromatogramm angefärbt:

1. mit Anilinphthalat nach PARTRIDGE (1949) (Sprühreagens: 0,93 g Anilin, 1,66 g Phthalsäure zu 100 ml wassergesättigtem Butanol; nach dem Besprühen das Chromatogramm 5 Min. auf 105° C erhitzen. Aldopentosen werden rosa, Aldohexosen braun);

2. mit Benzidin nach HORROCKS (1949) (Sprühreagens: 0,5 g Benzidin, 20 ml Eisessig, 80 ml Aethanol; im Trockenschrank erhitzen 5 Min. für Pentosen, 15 Min. für die übrigen reduzierenden Zucker bei 100 bis 105° C). Diese beiden Sprühreagenzien geben Farbreaktionen mit Zuckern, deren reduzierende Gruppe frei vorliegt, nicht mit der in der ATP gebunden vorliegenden Pentose.

Um die Pentose in der ATP zu erfassen, wurde der im UV-Licht durch die Absorptionseigenschaft des Adenins sichtbare Fleck ausgeschnitten, mit Wasser eluiert und mit dem Eluat die Pentosebestimmung nach MEJBAUM (1949) durchgeführt. 3 ml der eluierten Substanz wurden mit 3 ml Reagenslösung (1% Orcin in 0,1% $FeCl_3$ gelöst in konz. HCl 37,5%) versetzt und im kochenden Wasserbad 30 Min. erhitzt, dabei gibt die Pentose eine Grünfärbung. Nach dem Abkühlen wurde im Pulfrich-Photometer die Extinktion bei Filter S 666/3,5 abgelesen und an Hand der Eichkurve auf γ Ribose bzw. γ ATP umgerechnet. Auf den klaren Grün-Ton der Färbung ist zu achten, Glucose z. B. gibt bei dieser Reaktion einen störenden bräunlichen Farbton. Auf die Bedeutung der Leerwert-Korrektur bei verschiedenen

Chromatographie-Lösungsmitteln sei hier hingewiesen (s. S. 187). Mit dieser Methode ließen sich 1 γ Ribose in 6 ml Lösung, also 0,17 γ/ml quantitativ gesichert erfassen.

f) Absorptionsspektren

Die spektrophotometrischen Messungen wurden mit dem Zeiss-Spektralphotometer durchgeführt. Die UV absorbierenden Flecken im Chromatogramm wurden in Wasser oder mit n/10 NaOH eluiert. Gemessen wurde in Quarzküvetten von 10 mm Schichtdicke, von 210 mμ bis 320 mμ, teilweise auch bis 400 mμ in Teilschritten von 5 oder 2 mμ. Die Absorptionskurve ein und derselben Probe wurde neutral, alkalisch und sauer aufgenommen, zuerst annähernd neutral, d. h. p_H 6,5 (Eluat in Wasser), durch Zugabe von n/1 NaOH in die Quarzküvette, dann in n/10 NaOH und anschließend durch Zugabe von n/1 HCl in n/10 HCl. Da es sich hier nicht um quantitative sondern um eine qualitative Analyse handelt, konnte diese geringe Verdünnung beim Zusatz der NaOH bzw. HCl in Kauf genommen werden. In dem Vierer-Küvettensatz wurden gleichzeitig die Eluate der fraglichen Substanz und des Papierleerwertes gegen Wasser gemessen und dann rechnerisch korrigiert.

g) Autoradiogramme

Von Papierchromatogrammen mit radioaktiven Pflanzenextrakten wurden Autoradiogramme hergestellt. Das getrocknete Chromatogramm wurde auf Agfa-Röntgenpapier zwischen zwei 4 mm dicken Glasplatten im Dunkeln für 48 bis 72 Stunden exponiert, danach das Röntgenpapier in einem Spezial-Röntgenentwickler entwickelt. Bei langer Expositionszeit und hoher ^{32}P-Aktivität wurde anschließend eine verringerte Absorption der ATP-Flecken im UV-Licht von 260 mμ beobachtet. Das Autoradiogramm diente in diesen Untersuchungen nur zur qualitativen Analyse. Auf eine quantitative Auswertung der Schwärzung wurde verzichtet, da zur quantitativen Frage ein speziell entwickeltes Abtastgerät zum Geiger-Müller-Zählrohr exaktere Werte ergab (s. S. 174).

6. *Radioaktiver Phosphor* (^{32}P)

Zu den hier beschriebenen Versuchen kam nur ^{32}P als „trägerfreie Orthophosphorsäure" zur Anwendung, die wir in wäßriger Lösung vom Isotopen-Laboratorium der Medizinischen Forschungsanstalt der Max-Planck-Gesellschaft, Göttingen, bezogen.

Einzelheiten über die ^{32}P-Einlagerung in Algen werden im experimentellen Teil s. S. 196 besprochen.

Als Nachweisgerät für die radioaktive Strahlung diente das Strahlungsmeßgerät FH 41 der Firma Frieseke und Hoepfner, Erlangen-Bruck. Für Messungen radioaktiver Flüssigkeiten wurde das Glockenzählrohr (FHZ 12) benutzt. 10 ml der zu messenden Lösung wurden in einer kleinen Petrischale unter das in einem Stativ senkrecht angebrachte Glockenzählrohr gestellt und mindestens drei Vergleichszählungen innerhalb einer gewählten Zeiteinheit von jeder Probe zur Mittelwertbildung genommen. Die geometrischen Daten — Abstand zum Zählrohrfenster etc. — wurden stets streng gleichmäßig gehalten und nachkontrolliert.

Ein Wannenzählrohr (FHZ 13) diente zusammen mit einem Abtastgerät zur quantitativen Auswertung der Aktivität auf eindimensionalen Papierchromatogrammen. Abb. 3 zeigt das Abtastgerät[1]. Zwei gegeneinander verschiebbare

[1] Herrn Cloos, Feinmechanikermeister am Physiologischen Institut der Tierärztlichen Hochschule, Hannover, danken wir für die Herstellung, der Firma Frieseke und Hoepfner, Erlangen, für einige Anregungen.

Aluminiumplatten (*A*) lassen einen Spalt (*Sp*) frei, der sich kontinuierlich zwischen 0,5 und 20 mm Breite einstellen läßt. Unter diesem Spalt läuft eine Schiene mit Zahnradübersetzung (*S*), auf der ein Chromatogrammstreifen von 45 mm Breite und 50 cm Länge mit zwei Federn (*F*) eingespannt wird. Die Zahnradübersetzung führt zum Drehknopf (*D*); mit diesem kann das Chromatogramm in 1 mm Schritten — oder nach Wunsch in größeren — vor und rückwärts bewegt werden. Die

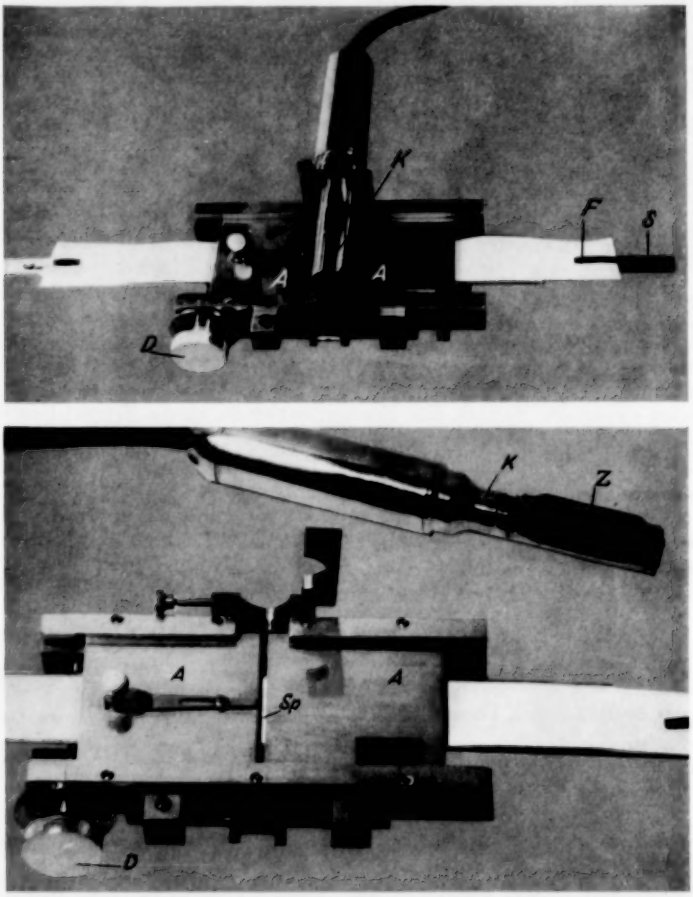

Abb. 3. Abtastgerät zur quantitativen Auswertung radioaktiver, eindimensionaler Papierchromatogramme. Erklärung der Bildbeschriftung im Text

Skala auf dem Drehknopf gibt 4,5 mm für 1 mm Schritt der Chromatogrammschiene. Durch diese Übersetzung 4,5:1 wird die Genauigkeit der 1 mm Schritte erhöht. Über dem Spalt (*Sp*) ist mit einem Halter die Kontaktfassung (*K*) für das Wannenzählrohr so angebracht, daß das Zählrohrfenster (*Z*) genau über die Mitte des Spaltes zu liegen kommt. Bei genügend hohen Aktivitäten und weit auseinandergezogenen Chromatogrammflecken genügte in den meisten Fällen eine Auszählung mit 4 mm-Schritten und der Zeit von einer Minute, an besonders wichtigen Stellen wurde dann in 2 mm-Schritten ausgezählt; gelegentlich wurde die Zeit auf

zwei, teilweise auf vier Minuten heraufgesetzt. Nach dem Auszählen standen die Chromatogramme für weitere Färbungen, z. B. auf Aminosäuren etc. oder zum Eluieren einzelner Flecken zur Verfügung.

Als Beweis für die Reproduzierbarkeit der Auszählmethode wurde auf dem gleichen Chromatogramm der gleiche Pflanzenextrakt einmal 20mal und das andere Mal nur 9mal am Startfleck aufgetragen. Die beiden Maxima, ATP mit 500 und 240 bzw. das anorg. Phosphat mit 1600 und 750 Imp/Min. geben sehr gut das quantitative Verhältnis der aufgetragenen Mengen 20:9 wieder. Das Ausplanimetrieren der Kurven bestätigt ebenfalls das Verhältnis der aufgetragenen Substanzmengen, vergrößert aber die Genauigkeit nicht weiter.

Experimenteller Teil

A. Qualitativer Nachweis von Adenosintriphosphorsäure (ATP) und ihren Derivaten

Adenosintriphosphorsäure geht nach Umbreit, Burris und Stauffer (1949) sowie Albaum und Mitarb. (1950) in die TES-lösliche Fraktion. Es wurde daher in dieser Arbeit der TES-unlösliche Teil nicht weiter analysiert.

Bei der Alkoholextraktion wurde ebenfalls der in Alkohol unlösliche Teil verworfen. Da ATP gut wasserlöslich ist und in dieser Arbeit schon bei der ersten Extraktion wasserhaltiger Alkohol verwendet wurde, so war ATP nur in dieser alkohollöslichen Fraktion zu suchen. Die gelegentlich diskutierten energiereichen Phosphat-Eiweißverbindungen (Bonner 1950) wurden in dieser Arbeit vorerst unberücksichtigt gelassen.

I. ATP-Nachweis in der Grünalge Ankistrodesmus

1. Vorversuche

a) Hinweise auf ATP durch Hydrolyse- und Enzymversuche. Um ATP in Grünalgen überhaupt erst einmal zu erfassen, mußte zunächst ein Test angewendet werden, der spezifisch für ATP ist. In zahlreichen Untersuchungen mit tierischen Geweben, Hefen oder Bakterien wurde bisher das sogenannte „7 Min.-Hydrolyse-Phosphat" den labilen Phosphatgruppen der ATP zugeschrieben. In der TES-löslichen Fraktion finden sich aber neben dem Adenylsäuresystem noch zahlreiche weitere Phosphatverbindungen gelöst — Hexosephosphate, Triosephosphate etc. —, von denen einige ebenfalls die Eigenschaft der leichten Spaltbarkeit bei 7 Min.-Hydrolyse besitzen (Umbreit und Mitarb. 1949, Albaum und Mitarb. 1950). Gl-1-P hydrolysiert z. B. sogar bei 7 Min., 1n HCl, 100° C zu 100%, während ATP nur zu 66% hydrolysiert. Diese 7 Min.-Hydrolyse ist als Nachweis für ATP also nicht spezifisch, trotzdem muß im Algenextrakt ein Anstieg des anorg. Phosphates nach Hydrolyse auftreten, wenn überhaupt ATP vorhanden ist. Einen solchen Anstieg des anorg. Phosphates konnte ich in der Tat bei der Hydrolyse von TES-Pflanzenextrakten feststellen.

Mehr als die 7 Min.-Hydrolyse kann eine spezifisch ATP spaltende Fermentreaktion aussagen. Nach KALCKAR (1944) spaltet eine aus Kartoffeln zu gewinnende Apyrase die zwei letzten Phosphatgruppen der ATP ab.

Der Fermentansatz bestand aus:

5 ml { 2 ml Apyrase (Herstellung s. S. 170)
0,4 ml $CaCl_2$ 0,5%ig
0,6 ml aqua dest.
2 ml TES-Algenextrakt oder ATP-Lösung (p_H 6,8).

Je nach vorhandener Menge TES-Extrakt und den gewünschten Abstufungen mit verschiedener Reaktionszeit etc. wurde ein Vielfaches dieses Reaktionsgemisches angesetzt. Das Reaktionsgemisch befand sich während der Reaktionszeit in einem mit einem Uhrgläschen abgedeckten Erlenmeyer bei 23 ± 1^0 C. Die Versuchsreihe wurde leider mit einem TES-Pflanzenextrakt durchgeführt. So lag von vornherein nur eine relativ geringe Menge ATP noch ungespalten vor, wie spätere papierchromatographische Trennungen und Versuche mit authentischer ATP zeigen sollten. Als Beginn der Reaktionszeit galt das Zukippen der Apyrase zu dem bereits temperierten Rest des Reaktionsgemisches. Am Ende der Reaktionszeit wurden 5 ml — bei hohem Phosphatgehalt 1 ml — mit Vollpipetten dem Reaktionsgemisch entnommen und in 25 ml Meßkolben abpipettiert, in denen zur anschließenden Phosphatbestimmung nach MARTLAND und ROBISON (s. S. 169) bis auf das Reduktionsmittel die Lösungen 1 und 2 (H_2SO_4 und Ammoniummolybdat) vorlagen und hier gleichzeitig das Fermenteiweiß fällten. (Über die Zeitabhängigkeit der Phosphatbestimmung s. S. 169.) Wurde zur Messung des Überschusses an Apyrase oder ATP weniger als 2 ml Apyrase oder 2 ml ATP-Lösung bzw. TES-Extrakt zugegeben, so wurde die fehlende Menge mit aqua dest. oder TES ausgeglichen, so daß das übliche Reaktionsgemisch auch hier stets aus einem Vielfachen von 5 ml bestand.

Den Phosphatanstieg bei Apyrase-Einwirkung auf TES-Algenextrakt und authentische ATP-Lösung zeigt die Tabelle 2.

Die Versuche I bis V sind jeweils mit getrennt hergestellter Apyrase durchgeführt. Bei den Versuchen mit authentischer ATP-Lösung wurde stets die gleiche Menge ATP vorgelegt. Beim Algenextrakt dagegen wurden bei Versuch I bis III die ersten drei TES-Extrakte vereinigt und auf 25 ml verdünnt, bei IV nur die ersten drei vereinigt und ohne weitere Verdünnung verwendet, bei V wurde nur noch der erste TES-Extrakt unverdünnt benutzt, daher der erhöhte Phosphatgehalt.

Tabelle 3 zeigt die Zunahme des anorganischen Phosphates verschiedener ATP-Konzentrationen bei gleicher Apyrase-Vorlage. Nach 24 Stunden war bei allen drei Konzentrationen die Phosphatmenge frei

Tabelle 2. *Apyrase-Wirkung auf TES-Algenextrakte und authentische ATP-Lösungen*

		γ PO_4			Anstieg in γ PO_4		Anstieg [1] um %	
		0 min	30 min	2 Std	—30 min	—2 Std	—30 min	—2 Std
a) Algenextrakt								
Versuch:	I 5. 11. 51	63,5	75,5	93,5	12,0	30,0	19,0	47,0
	II 5. 11. 51	57,5	—	70,5	—	13,0	—	22,5
	III 6. 11. 51	62,0	—	73,2	—	11,2	—	18,0
	IV 12. 11. 51	128,2	140,0	150,0	11,8	21,8	9,2	17,0
	V 4. 3. 52	395,0	—	495,0	—	100,0	—	25,4
b) Authentische ATP-Lösungen								
Versuch:	I 6. 12. 51	76,5	—	135,3	—	58,5	—	77,0
	II 7. 12. 51	86,0	122,5	148,5	36,5	62,5	42,5	72,5
	III 8. 12. 51	61,0	95,0	—	34,0	—	56,0	—
	IV 21. 2. 52	85,5	124,0	150,5	38,5	65,0	45,0	76,0
	V 21. 2. 52	74,0	117,0	134,0	43,0	60,0	58,0	81,0

[1] Ausgangskonzentration = 100 gesetzt.

Tabelle 3. *Apyrase-Wirkung auf authentische ATP-Lösungen verschiedener Konzentration*

Vorgelegt ATP	γ PO_4 abgespalten in			Anstieg in γ PO_4		Errechnete Max. in γ PO_4
	0 min	30 min	24 Std	—30 min	—24 Std	
1000 γ	104,5	270,0	462,5	165,5	358,0	374
500 γ	91,0	171,0	282,0	80,0	191,0	187
250 γ	74,0	118,0	188,0	44,0	114,0	94

gesetzt, die unter der Voraussetzung, daß die Apyrase nur die zwei letzten Phosphatgruppen der ATP abspaltet, zu erwarten ist. Es wurde hiernach also in allen Fällen mit Apyrase-Überschuß gearbeitet. Die Phosphatabspaltung in Tabelle 3 nach 24 Stunden bei 500 γ und 250 γ ATP-Vorlage über den theoretischen Wert hinaus läßt sich durch eine Abspaltung auch der dritten Phosphatgruppe erklären. Nach BAILEY (1949) und KRISHNAN (1949) soll die Apyrase, und zwar gerade die gereinigte Fraktion, in hoher Konzentration noch eine Nucleotidase enthalten; dieses würde unseren Befund erklären.

Als Ergebnis dieser Versuchsreihe darf man sagen: *Der TES-Algenextrakt reagiert auf Apyrase-Einwirkung eindeutig mit einem Anstieg des anorganischen Phosphates.*

Diese Vorversuche mit Hydrolyse- und Apyrase-Reaktionen sollten und können keinen *Beweis* für das Vorhandensein von ATP in den Grünalgen erbringen. Da die erhaltenen Ergebnisse aber ein deutlicher *Hinweis* auf das Vorhandensein von ATP waren, wurde daraufhin eine Auftrennung des Algenextraktes mit Hilfe der Papierchromatographie in Angriff genommen.

b) Modellversuche zur Frage der Labilität der ATP. Bei den Apyrase-Versuchen war das Pflanzenmaterial mit TES extrahiert, während die authentische ATP in Wasser gelöst war. Da schon kalte TES (LOWRY und LOPETZ 1946, KAMEN und SPIEGELMANN 1948, HOLZER und LYNEN 1950, GOODMAN, BRADLEY und CALVIN 1953, BENSON 1954) sehr labile Phosphatverbindungen teilweise hydrolysiert, so erschien es ratsam, mit authentischer ATP die Labilität der beiden letzten Phosphatgruppen unter den Bedingungen zu verfolgen, denen die ATP der Algen bis zur endgültigen quantitativen Erfassung ausgesetzt war.

Tabelle 4. *Vergleich von in aqua dest. und in 10% TES gelöster authentischer ATP. Phosphatspiegel in γ PO_4 vor und nach der 7 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° C*

Versuch Nr.[1]	ATP gelöst in aqua dest.			ATP gelöst in TES		
	Hydrolyse		Anstieg um	Hydrolyse		Anstieg um
	ohne	7 min		ohne	7 min	
I	38	160	320%	—	—	—
II	65	215	230%	167	212	27%
III	68	284	318%	—	—	—
IV	73	279	282%	210	274	30,5%
Im Mittel			287,5%			28,8%

[1] Je Versuch gleiche ATP-Einwaage

Authentische ATP wurde gleichzeitig einerseits in aqua dest., andererseits in 10% TES gelöst und für 48 Stunden im Kühlschrank bei + 5° C aufbewahrt. (Der Pflanzenextrakt stand vor der Apyrase-Reaktion in der Regel nicht länger als 16 Stunden im Kühlschrank.) Danach wurde das 7 Min. labile Phosphat von beiden ATP-Lösungen bestimmt.

Den Gehalt an anorganischem Phosphat vor und nach der 7 Min.-Hydrolyse zeigt die Tabelle 4. Die in TES gelöste ATP ist in Kälte bereits *vor* der 7 Min.-Hydrolyse zum größten Teil allein durch die TES-Wirkung gespalten. Bei mehreren weiteren Parallelversuchen enthält die in Wasser gelöste ATP nach drei Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank im Durchschnitt 60 γ PO_4/1000 γ ATP, während der Phosphatgehalt in 10% TES bei 168 γ PO_4/1000 γ ATP liegt. Bedenkt man ferner, daß die zwei labilen Phosphatgruppen bei 1000 γ ATP einem Phosphatgehalt von 374 γ entsprechen, so liegen bei der in Wasser gelösten ATP 16,5%, bei der in TES gelösten ATP aber 45% des labilen Phosphates abgespalten vor. Diese durch kalte TES verursachte Spaltung wiegt noch schwerer, sobald man bedenkt, daß bei der 7 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° C ja nur 66% des labilen Phosphates hydrolysiert werden.

Noch deutlicher wurden diese Unterschiede bei papierchromatographischer Trennung. Abb. 4 zeigt ATP links in aqua dest. (a), rechts in 10% TES (b) gelöst. In diesem Fall wurde die ATP *sofort* nach dem Lösen auf die Startflecken aufgetragen und das Chromatogramm anschließend gestartet. Bei der in TES gelösten ATP tritt deutlich eine Verschiebung zugunsten des AMP-Anteiles auf.

Nach den hier angeführten Beispielen ist in TES-Pflanzenextrakten während der Extraktionszeit — auch bei sofort anschließender Neutralisation oder Verwendung zur Papierchromatographie — *mit einer beträchtlichen Hydrolyse der vorhandenen ATP allein durch die TES-Einwirkung zu rechnen.* Auf Grund dieser Ergebnisse bevorzugte ich die Alkohol-Extraktion.

Da ATP in abs. Alkohol unlöslich ist, muß mit möglichst wäßrigem Alkohol extrahiert werden, andererseits muß noch eine vollständige Eiweißfällung gewährleistet sein. Auch mit hoher Tourenzahl abzentrifugierte Algen enthalten in den Kapillarräumen zwischen den Einzelzellen immer noch Wasser; dieses Kapillarwasser und der Wassergehalt der Algenzellen muß mit berücksichtigt werden. Eine Extraktion mit 83% Aethanol erwies sich hier als brauchbar.

Bekanntlich wurden bisher überwiegend TES-Extrakte zur Bestimmung des labilen Phosphates durch 7 Min.-Hydrolyse benutzt. Die hier gezeigte starke Hydrolysewirkung im kalten TES-Extrakt und die dadurch viel zu geringen Werte bei der Hydrolyse lassen es ratsam erscheinen, in Zukunft andere Extraktionsmethoden anzuwenden bzw. die Ergebnisse älterer Untersuchungen nochmals nachzuprüfen.

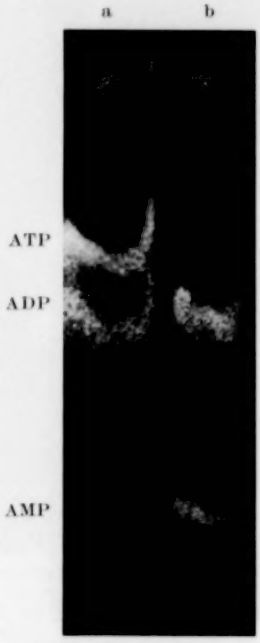

Abb. 4. Vergleich von in aqua dest. und 10% TES gelöster authentischer ATP, sofort nach dem Lösen der ATP gestartet. a In aqua dest., b in TES gelöst. UV-Photo, Isobuttersäure-Essigsäure, aufsteigend, 24 Stdn

2. Identifizierung durch Papierchromatographie

a) UV-Absorption. Das nach dem Photoprintverfahren gewonnene UV-Photo eines Chromatogrammes von authentischer ATP zeigt Abb. 5 für Isobuttersäure-Essigsäure als Lösungsmittel und Abb. 14 für Butanol-Essigsäure. Die reine ATP, hier in Wasser gelöst, gibt also in Isobuttersäure drei und in Butanol nur zwei absorbierende, auf der Photographie weiße Flecken. Die ersten Chromatogramme von Algenextrakten ließen bei TES-Extraktion nur ganz schwach den als AMP bezeichneten vorderen Absorptionsfleck erkennen, während bei Alkoholextrakten nur der ATP- und ADP-Fleck auf Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen zu finden war. Es galt also zuerst, den Algenextrakt weiter zu konzentrieren.

Bei TES-Extrakten ließ sich eine Konzentrierung wegen der gleichzeitigen Konzentrierung der TES nicht durchführen. Eine zu hohe TES-Konzentration am Startfleck gibt Störeffekte bei der Chromatogramm-Entwicklung. Der Einengung

des Alkoholextraktes dagegen waren vom Extraktionsmittel her keine Grenzen gesetzt. Als ein neues Hindernis erwies sich aber die gleichzeitige Anreicherung anderer, zum Teil störender Substanzen des Algenextraktes. Bei zu starker Einengung verursachen diese ein Schleppen aller im Algenextrakt befindlichen Substanzen, so daß keine gute chromatographische Trennung mehr zustande kommt. Es durfte also die Konzentrierung des Alkoholextraktes nur so weit geführt werden, daß die vollständige Auftrennung gerade noch gewährleistet, andererseits die Konzentration der vorhandenen ATP und ihrer Derivate so hoch wie möglich war. Bei *Ankistrodesmus* gelang dieses am besten bei einer Extraktion mit 83% kaltem Aethanol und mehrmaligem Eintrocknen (5 bis 10mal) am Startfleck des Chromatogrammes. Über einige Versuche, durch weitere Vortrennungen diese störenden Substanzen von der ATP-Fraktion zu trennen, wird bei der Gewinnung der Extrakte aus *Helodea* und *Spinacia* noch berichtet (s. S. 194).

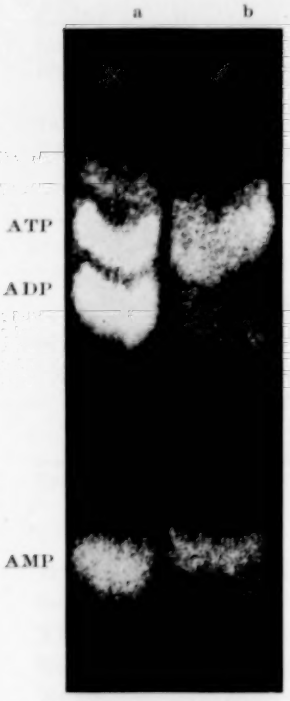

Abb. 5. Vergleich von Algenextrakt mit authentischer ATP. UV-Photo eines Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammes, absteigend, 18 Stdn. a Authentische ATP, b Algenextrakt

Den Vergleich der UV-Photos von Algenextrakt und authentischer ATP erlaubt Abb. 5. Absorbierende Flecken im Algenextrakt mit dem gleichen R_f-Wert der authentischen ATP sind deutlich zu erkennen. Auch Cochromatographie von reiner ATP mit Algenextrakt — also reine ATP und Algenextrakt zusammen auf ein- und demselben Startfleck aufgetragen — zeigt eine völlige Übereinstimmung des R_f-Wertes von authentischer ATP und Algen-ATP. Die charakteristische violette Farbe der ATP-Flecken bei Bestrahlung mit dem gefilterten Licht der UV-Lampe war beim Algenextrakt ebenfalls zu finden.

Nach *dieser Übereinstimmung im R_f-Wert bei Vergleichs-ATP und Algen-ATP* nach papierchromatographischer Trennung war zunächst zu klären, um welche Spaltprodukte es sich bei den drei Absorptionsflecken bei Isobuttersäure und den zwei Flecken bei Butanol handelt. Die Untersuchungen über den Abbau der ATP bei TES-Extraktion (Abb. 4) und die weiter unten geschilderten Phosphatfärbungen und Hydrolyseversuche ließen beim ersten Absorptionsfleck mit dem kleinsten Wanderungsweg auf ATP schließen, beim zweiten (bei Butanol-Essigsäure mit dem ersten zusammenfallend) auf ADP und beim dritten auf AMP.

Erst im Sommer 1953 kam ich in den Besitz weiterer authentischer Adeninderivate. Bei deren Vergleichschromatographie zeigte sich, daß Adenosin und Adenin einen viel größeren R_f-Wert haben (vgl. z. B.

Abb. 6). Die eingeführten Bezeichnungen von ATP und ADP ließen sich bestätigen. Auch die aus USA als „chromatographically pure" gelieferte ADP spaltet unter den hier angewandten Chromatographie-Bedingungen etwas AMP ab, wie es auch bei reiner ATP und bei Algen-ATP zu finden ist. Die Vergleichschromatographie von authentischer Hefeadenylsäure (A_3MP) und Muskeladenylsäure (A_5MP) zeigt dagegen einen größeren R_f-Wert als der von mir als Adenosinmonophosphat

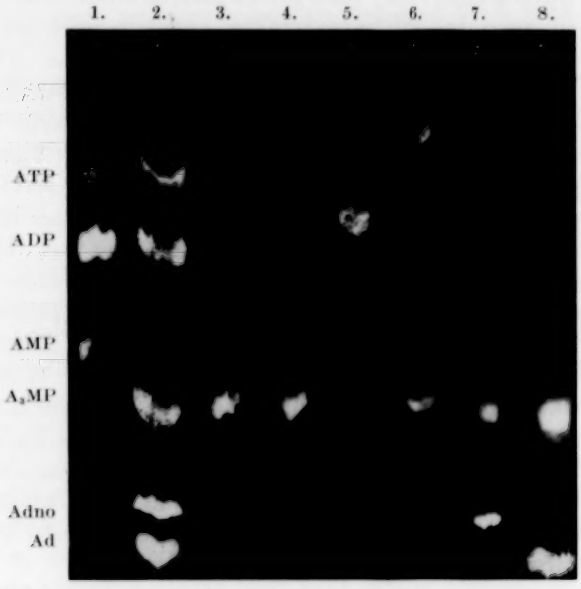

Abb. 6. UV-Photo eines Isobuttersäure-Ammoniak-Chromatogrammes von authentischen Substanzen. Absteigend, 24 Stdn. 1. ATP, gelöst in 1 n HCl, 2. ATP, ADP, A_3MP, A_3MP, Adenosin, Adenin, 3. A_5MP, 4. A_3MP, 5. ADP, 6. ATP, gelöst in aqua dest. und A_3MP, 7. Adenosin, A_3MP, 8. Adenin, A_3MP

(AMP)[1] bezeichnete Absorptionsfleck hat. Dieser Unterschied wurde in mehreren Lösungsmitteln wiedergefunden (Isobuttersäure-Essigsäure, Butanol-Essigsäure, Isobuttersäure-Wasser-Ammoniak). Ebenso gibt Cochromatographie von A_3MP und A_5MP mit ATP oder ADP oder Pflanzenextrakt eindeutig zwei getrennte Flecken für AMP und A_3MP (bzw. A_5MP).

Auch nach Entkationisierung von authentischer ATP und ADP durch den Kationenaustauscher Dowex 50, 20 bis 50 mesh gibt die von ATP und ADP abgespaltene AMP bei anschließender Papierchromatographie genau den gleichen R_f-Wert, der auch ohne Entkationisierung erhalten wird. Da dieses AMP, wie später

[1] In dieser Arbeit wird im folgenden das bei ATP, ADP und Pflanzenextrakt gefundene Adenosinmonophosphat mit AMP abgekürzt, im Gegensatz dazu die authentische Hefeadenylsäure mit A_3MP und die authentische Muskeladenylsäure mit A_5MP bezeichnet.

noch genauer gezeigt wird, ein pentose- und phosphathaltiges Spaltprodukt der authentischen ATP, ADP und der Pflanzen-ATP ist, andererseits der R_f-Wert sich aber deutlich von dem der gekauften A_3MP und A_5MP unterscheidet, so liegt hier wahrscheinlich ein Isomer des Adenosinmonophosphates vor.

Nachdem die Übereinstimmung der R_f-Werte von authentischer ATP mit der im Algenextrakt vorhandenen ATP gefunden und die Identifizierung der drei bei 260 mμ absorbierenden Flecken als ATP, ADP und AMP durchgeführt war, blieb die Aufgabe zu untersuchen, welche anderen Verbindungen des Pflanzenextraktes ebenfalls noch bei 260 mμ eine Absorption zeigen und bei ähnlichem R_f-Wert eine ATP vortäuschen könnten. Außer den Nucleotiden zeigen vor allem die zyklischen Aminosäuren bzw. Peptide bei 260 mμ noch eine starke Absorption. Hier standen mir Tryptophan, Phenylalanin und Tyrosin als authentische Vergleichssubstanzen zur Verfügung. Die R_f-Werte dieser drei Aminosäuren sind aber erheblich größer, somit scheidet eine Verwechslung mit diesen drei freien zyklischen Aminosäuren aus. Um auch ihre Dipeptide oder Tripeptide auszuschließen, wurden zahlreiche Papierchromatogramme von Pflanzenextrakten mit Ninhydrin angefärbt. Eine Deckung der mit Ninhydrin gefärbten Flecken mit den Absorptionsflecken von ATP, ADP und AMP liegt eindeutig *nicht* vor. Wohl liegen auf den Chromatogrammen bei geringer Laufzeit Ninhydrin-positive Flecken in unmittelbarer Nähe von ADP und AMP oder überlagern diese zu einem Teil. Bei längerer Laufzeit sind die Ninhydrin-positiven Flekken aber vollständig von den ATP-, ADP- und AMP-Absorptionsflecken zu trennen. Eine *Verwechslung mit Aminosäuren oder Peptiden konnte also mit Sicherheit ausgeschlossen* werden.

Inosintriphosphorsäure, Uridyltriphosphorsäure und weitere Purin- und Pyrimidinderivate standen mir als Nucleotide leider nicht zur Verfügung. Mit Hilfe der Hydrolyse und des Absorptionsspektrums der freien Basen konnten aber weitere Nucleotide ausgeschlossen werden, wie weiter unten (s. S. 188) im einzelnen berichtet wird.

Eine UV-Absorption bei 260 mμ und speziell Adenin im Molekül findet sich u. a. auch noch bei der Wirkgruppe der Pyridinfermente, also den Purin-Pyridin-Nucleotiden, wozu Di- und Triphosphopyridinnucleotid (DPN und TPN) gehören. Da bei diesen Nucleotiden bei Hydrolyse ebenfalls Adenin auftritt, konnte auf Grund des Absorptionsspektrums der freien Base hier nicht entschieden werden, ob DPN und TPN die ATP auf dem Chromatogramm überlagern. Im September 1953 erhielt ich aus den USA authentische DPN „chromatographically pure" und konnte es vergleichend chromatographieren. *DPN* zeigt bei Butanol-Essigsäure den gleichen R_f-Wert wie ATP und ADP, dagegen *unterscheidet es sich von ATP und ADP deutlich* bei Chromatographie in Isobuttersäure-Essigsäure und Isobuttersäure-Wasser-Ammoniak

(s. Tabelle 5). Bei Chromatogrammen von Algenextrakten in Isobuttersäure-Lösungsmitteln konnte bisher kein stärker absorbierender Fleck mit dem R_f-Wert von DPN gefunden werden; entweder ist die Konzentration von DPN für das in dieser Arbeit benutzte Photoprintverfahren zu niedrig, oder es geht, an andere Komponenten gebunden, bei der TES- oder Alkoholextraktion in die unlösliche Fraktion.

Bei späteren quantitativen Messungen des ^{32}P-Gehaltes der ATP wurde stets mit zwei Lösungsmitteln (Butanol-Essigsäure und Isobuttersäure-Essigsäure) chromatographiert, um einen eventuellen Gehalt an ^{32}P in DPN und dadurch zu hohen ^{32}P-Wert der ATP bei Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen auszuschließen.

b) Phosphatnachweis. Die Absorption bei 260 mμ spricht nur für das Vorhandensein des Adenins oder einer anderen Purin- oder Pyrimidinbase an den betreffenden weißen Stellen der UV-Photos. Die Pentose der ATP konnte mit den üblichen Färbemethoden für Hexosen und Pentosen auf dem Papierchromatogramm nicht nachgewiesen werden, da sie in der ATP gebunden vorliegt und die Färbungen auf einer Reaktion der frei vorliegenden Carbonylgruppe beruhen. Dagegen mußte die Phosphatkomponente auf dem Papierchromatogramm mit der Molybdän-Blau-Reaktion nach Hanes und Isherwood anzufärben sein. Nach Abänderung dieser Methode (s. S. 172) gelang mir dieser Phosphatnachweis. *Es zeigen alle drei UV-Absorptionsflecken* der Isobuttersäure-Chromatogramme und die zwei bei Butanol-Essigsäure-Chromatographie auch *Phosphatgehalt*; und zwar geben die ersten zwei (ATP und ADP) die grünblaue Farbe des anorganischen Phosphates, während der vorderste (AMP) die hellblaue Farbe des organisch gebundenen Phosphates zeigt. Danach kann auf ATP und ADP mit leicht hydrolysierbaren und AMP mit der stabileren Phosphatgruppe geschlossen werden. Außerdem läßt die Intensität der Färbung auf eine größere Menge Phosphat im ATP-Fleck gegenüber dem ADP-Fleck schließen. Hinsichtlich der hellblauen Farbe verhalten sich bei der Phosphatfärbung authentische A_3MP und A_5MP genau wie AMP. Der Unterschied von AMP zu ATP und ADP wird hier besonders deutlich.

Tabelle 5. *R_{AMP}-Werte[1] für DPN im Vergleich mit ATP in verschiedenen Lösungsmitteln*

Lösungsmittel	ATP	ADP	DPN
Butanol-Essigsäure	0,38	—	0,38
Isobuttersäure-Essigsäure .	0,38	0,51	0,76
Isobuttersäure-NH_3	0,44	0,67	0,91

[1] AMP = 1,00 gesetzt, da Durchlaufchromatographie angewandt wurde.

Die Absorptionsflecken des Pflanzenextraktes decken sich ebenfalls deutlich mit Phosphatflecken. Daneben waren beim Algenextrakt einige weitere, allerdings nur schwache Flecken organisch gebundenen Phosphates zu erkennen und vor allem eine sehr große Menge anorganischen Phosphates.

Die Phosphatanfärbung des AMP-Fleckes war beim Algenextrakt oft sehr schwach, konnte aber besonders auf den etwas kompakteren Flecken der Butanol-Essigsäure-Chromatogramme sicher erkannt werden. Auf den Autoradiogrammen mit ^{32}P lassen sich noch viel mehr Phosphatverbindungen erkennen, als die Phosphatfärbung auf ^{31}P es zuläßt (auf die Autoradiogramme wird später noch eingegangen, s. S. 197).

c) Hydrolyse. Der R_f-Wert, die Eigenschaft bei 260 mμ zu absorbieren, die charakteristische Farbe der Absorptionsflecken bei Bestrahlung mit 260 mμ und der Phosphatgehalt stimmten also bei authentischer ATP und den zu definierenden Flecken des Algenextraktes überein. Eine weitere Möglichkeit zur Identifizierung ist das Verhalten unter verschiedenen Hydrolysebedingungen.

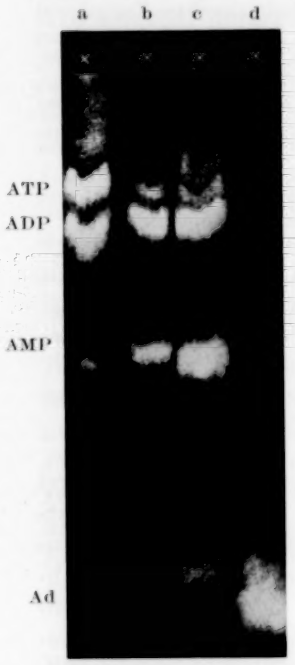

Abb. 7. Papierchromatographische Trennung von authentischer ATP nach verschieden starker Hydrolyse. UV-Photo, Isobuttersäure-Essigsäure, absteigend, 18 Stdn. a Nicht hydrolysierte Kontrolle, b 60 Min. bei p_H 4,5 hydrolysiert, c 0 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl, d 7 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl

Die Versuche wurden vergleichend einerseits mit authentischer ATP und ihren Derivaten und andererseits mit Algenextrakten durchgeführt. *Je nach der Stärke der Hydrolyse konnten alle Übergänge des Abbaues von ATP bis zu Adenin hergestellt werden*, wobei Adenosin als Spaltprodukt nicht gefunden wurde. Die schwächste Hydrolyse bei p_H 4,5 im kochenden Wasserbad für 60 Min. (BIELSCHOWSKY) führt zu einer Anreicherung der ADP und AMP auf Kosten der ATP (Abb. 7 b), Adenin tritt noch nicht auf. Stärker hydrolysierend wirkt schon das Stehen für etwa 2 Stunden bei Zimmertemperatur in 1 n HCl, hier als 0 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl bezeichnet (Abb. 7 c). Hierbei ist neben der Anreicherung von ADP und AMP schon wenig Adenin zu finden. Erhitzt man die ATP-Lösung in 1 n HCl für 4 Min. im kochenden Wasserbad, so tritt bereits neben einem geringen Anteil AMP als stärkste Fraktion Adenin auf. Bei 7 Min.-Hydrolyse bei 100° C findet sich neben viel Adenin nur noch eine Spur von AMP, die bei 10 Min. oder längerer Hydrolysezeit dann ganz verschwindet (Abb. 7 d). Daß es sich bei dem Hydrolyseprodukt um Adenin[1] und nicht Adenosin handelt, zeigt die Vergleichschromatographie auf Abb. 8, I und II. Hydrolysiert man Adenosin in 1 n HCl

[1] In der vorläufigen Mitteilung (SIMONIS und SCHWINCK 1953) wurde dieser Fleck als Adenosin bezeichnet, er erwies sich bei der weiteren Untersuchung als Adenin.

bei 100° C für 30 Min., so geht es ebenfalls in Adenin über (Abb. 8, I). Auch ADP sowie A_3MP geben bei 7 Min.-Hydrolyse Adenin.

Bemerkenswert ist, daß der Abbau von authentischer ATP und ADP stets über AMP läuft. Diese Rolle der AMP als Zwischenstufe beim hydrolytischen Abbau zeigt deutlich, daß es sich hier um ein Adenosinmonophosphat im Gegensatz zu ATP und ADP handeln muß.

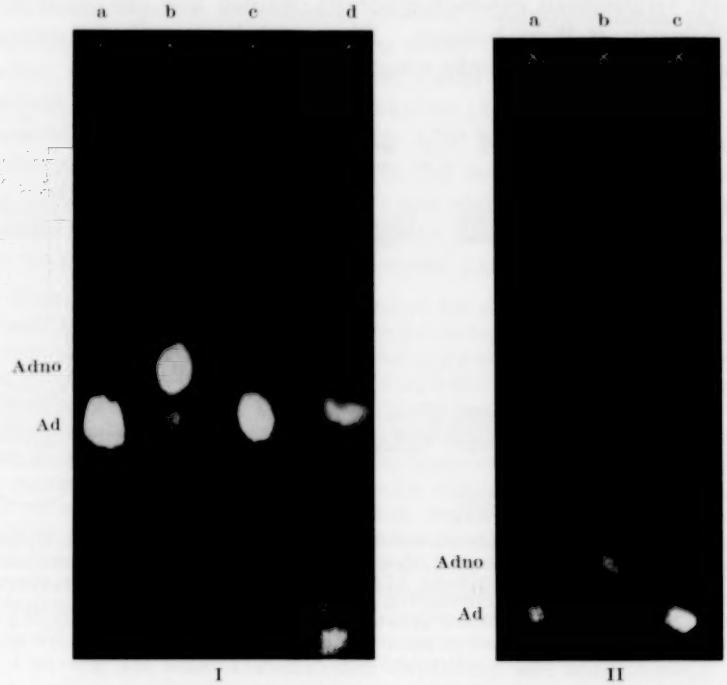

Abb. 8 I und II. Vergleich von authentischem Adenin, Adenosin und 7 Min.-Hydrolyseprodukten. I) UV-Photo, Aethanol-Ameisensäure, absteigend, 25 Stdn. a Adenosin, hydrolysiert, b Adenosin, c ATP, 7 Min. hydrolysiert, d Algenextrakt, 7 Min. hydrolysiert. II) Isobuttersäure-Essigsäure, absteigend, 23 Stdn. a AMP, 7 Min. hydrolysiert, b Adenosin, c Adenin

Wie bei authentischer ATP, konnte der stufenweise Übergang auch beim Algenextrakt verfolgt werden. Versuche mit Hydrolyse bei p_H 4,5 für 60 Min., sowie in 1 n HCl für 0, 4, 7, 10, 15 und 60 Min. bei 100° C wurden vergleichend durchgeführt. Abb. 8, I zeigt Algenextrakt und Vergleichs-ATP nach 7 Min.-Hydrolyse. Die Übereinstimmung der Veränderung nach 7 Min.-Hydrolyse wurde außerdem durch Anwendung von drei verschiedenen Chromatographielösungsmitteln (1. Isobuttersäure-Essigsäure, 2. Butanol-Essigsäure, 3. Ameisensäure-Aethanol-Wasser) gesichert.

Bei der Hydrolyse von Algenextrakt findet man im Gegensatz zur authentischen ATP noch einen weiteren UV-absorbierenden Fleck, der ganz kurz hinter der Frontlinie des Lösungsmittels liegt (s. Abb. 8, I d).

Ohne Hydrolyse ist dieser Fleck nicht vorhanden und tritt deutlich erst bei einer Hydrolysezeit von 4 Min. und länger in 1 n HCl und 100° C auf. Da im allgemeinen wegen des geringen R_f-Wertes der ATP mit Durchlaufchromatogrammen gearbeitet wurde, ist dieser Fleck meistens mit herausgelaufen. Dem großen R_f-Wert nach kann es sich hier nicht um Hypoxanthin, Guanin, Uracil oder Thymin handeln, die mit Adenin zusammen vergleichend chromatographiert wurden und alle einen eindeutig kleineren R_f-Wert besitzen. Dieses unbekannte Hydrolyseprodukt des Algenextraktes wurde vorerst nicht weiter analysiert.

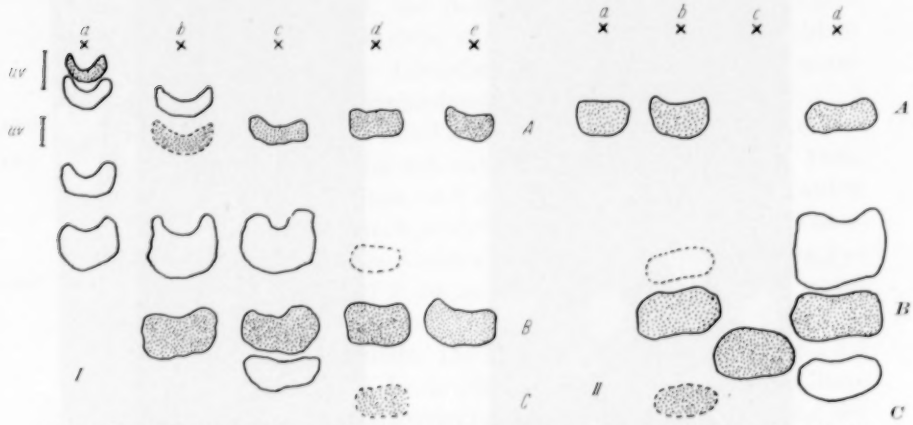

Abb. 9 I und II. Auftreten von Pentosen nach Hydrolyse. I) a Algenextrakt ohne Hydrolyse, b Algenextrakt 0 Min.-Hydrolyse, c Algenextrakt, 7 Min-Hydrolyse, d authentische ATP, 7 Min.-Hydrolyse, e authentische ATP, 0 Min.-Hydrolyse. II) a authentische Ri-5-P, b authentische ATP, 7 Min.-Hydrolyse, c authentische d-Ribose, d Algenextrakt, 15 Min.-Hydrolyse. Mit Anilin-Phthalat gefärbte Chromatogramme, Butanol-Essigsäure, absteigend, 48 Stdn. Weiß = Hexosen, gepunkt = Pentosen, gestrichelter Umriß = sehr schwache Flecken

d) Pentosenachweis. Da bei Hydrolyse die ATP schließlich in Adenin übergeht, muß nach Hydrolyse die Zuckerkomponente der ATP frei vorliegen und somit auch auf dem Chromatogramm die übliche Farbreaktion auf Zucker geben. Während Chromatogramme von nicht hydrolysierter authentischer ATP keinen einzigen Zuckerfleck zeigen, treten bei Chromatographie nach 7 Min.-Hydrolyse bei authentischer ATP drei Pentoseflecken (A, B und C auf Abb. 9, I d) auf, die mit Anilin-Phthalat nach PARTRIDGE angefärbt die rosa Farbe der Aldopentosen im Gegensatz zu der braunen der Aldohexosen zeigen.

Die Intensität der drei Pentoseflecken ist sehr verschieden. Die Hauptmenge zeigt der Fleck B; während der Fleck A mit dem kleinsten R_f-Wert noch deutlich auftritt, ist der Fleck C nur schwach zu erkennen. Die Vergleichschromatographie von Ribose-5-phosphat (Ri-5-P) und d-Ribose ergab bei Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen, daß es sich bei dem Fleck A eindeutig um Ri-5-P handelt. Die authentische d-Ribose dagegen zeigt einen etwas größeren R_f-Wert als der

Pentosefleck B (s. Abb. 9, II). Der Frage der weiteren Identifizierung der Pentoseflecken B und C wurde nicht nachgegangen. ATP, bei p_H 4,5 für 60 Min. im kochenden Wasserbad hydrolysiert, zeigt wie die nicht hydrolysierte ATP keinen Pentosefleck. Bei 0 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl (Abb. 9, I e) tritt schon deutlich der Fleck B auf und z. T. schwach bereits Ri-5-P. Erst nach 7 Min. Erhitzen bei 100° C (Abb. 9, I d) tritt Ri-5-P deutlicher hervor und schwach der Pentosefleck C hinzu, während die Intensität des Fleckes B gleich zu bleiben scheint.

Die auf Zucker angefärbten Butanol-Essigsäure-Chromatogramme von Algenextrakten zeigen, wie zu erwarten, ein ganz anderes Bild. Neben mehreren Hexoseflecken ist schon bei nicht hydrolysiertem Extrakt auch ein Pentosefleck vorhanden (Abb. 9, I a). Der UV-absorbierende Fleck mit dem R_f-Wert der ATP wird beim Algenextrakt zur Hälfte von einer Hexose, zum andern Teil von einer Pentose überlagert. Der AMP-Fleck wird dagegen nicht von anderen Zuckern gedeckt. Es wurden nun auch für den Algenextrakt das Verhalten nach verschieden starker Hydrolyse näher untersucht (Abb. 9, I a—c).

Während bei der schwächsten Hydrolyse bei p_H 4,5 und 60 Min. bei 100° C nur eine Intensitätsverschiebung innerhalb der vorhandenen Flecken zu beobachten ist, tritt bei 0 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl analog zur authentischen ATP der Pentosefleck B neu auf. Bei 7 Min.-Hydrolyse wird auch Ri-5-P (A) deutlicher sichtbar. Bisher wurde der Pentosefleck C nicht gefunden, der ja auch bei authentischer ATP nur schwach auftritt und vermutlich bei dem geringen ATP-Gehalt der Algenextrakte unter der für diese Anfärbung erforderlichen Konzentration liegt. Bei der Hydrolyse von Algenextrakten traten aber nicht nur die zwei im Vergleich zur authentischen ATP zu erwartenden Pentoseflecken hinzu, sondern gleichzeitig verschiebt sich erheblich die Intensität der Hexoseflecken; außerdem treten neue hinzu und vor allem verschwindet auch die Pentose, die den UV-Fleck auf Höhe der ATP vor Hydrolyse überlagert. Somit war nicht sicher auszusagen, woher Ri-5-P und der intensivere Pentosefleck B im Algenextrakt stammen, obwohl ihr Auftreten unter den verschieden starken Hydrolysebedingungen im Vergleich zur authentischen ATP den Ursprung aus einer ATP-ähnlichen Verbindung sehr wahrscheinlich macht.

Um die Pentose in der ATP oder AMP selbst zu erfassen — ohne vorher durch Hydrolyse die ATP und im Pflanzenextrakt dazu noch zahlreiche andere Verbindungen zu zerstören und Gleichgewichte zu verschieben —, wurde nach dem Verfahren von Mejbaum mit der Orcin-Reaktion die Pentose im Eluat nachgewiesen. Die Lage der ATP bzw. ADP und AMP auf den Chromatogrammen war durch das UV-Photo bekannt, bzw. konnte im gefilterten Licht der UV-Lampe an der violetten Farbe mit bloßem Auge festgelegt werden. Diese Flecken wurden in aqua dest. eluiert. Die Chromatographielösungsmittel machten sich bei der Pentosebestimmung nach Mejbaum sehr störend bemerkbar. Ribose, Xylose und Arabinose geben mit dieser Methode eine Grünfärbung. Wie ich bei Leerkontrollen feststellen konnte, geben auch Eluate von Leerchromatogrammen, die in Butanol-Essigsäure entwickelt wurden, eine Grünfärbung, und zwar so stark, daß etwa 10 cm^2 Papier einen ATP-Wert von 8 γ vortäuschen. Das Papier für die

Leerkontrollen wurde stets auf der Höhe der ATP-Flecken demselben Chromatogramm entnommen, so daß die Einwirkung des Lösungsmittels (Zeit, Waschеffekt etc.) exakt vergleichbar war. Während Butanol-Essigsäure als Lösungsmittel genau den hellgrünen Farbton der ATP oder Ribose entwickelt, gibt Isobuttersäure-Essigsäure einen bräunlichen Farbton ohne Grünstich. Dieser bräunliche Farbton weist bei 10 cm^2 Papier eine Absorption auf, die einem ATP-Gehalt von 3,5 γ entspricht. Ebenfalls einen reinen Braunton gibt Glucoselösung; hier geben 200 γ Glucose den gleichen Extinktionswert wie 23 γ ATP. Um diese Fehlerquellen auszuschalten, wurde bei weiteren Arbeiten zu jedem ATP- oder AMP-Eluat der Extinktionswert der dazugehörigen Leerkontrolle genau bestimmt und so der wahre Gehalt an Ribose ermittelt.

Leider stand mir zur Zeit des Pentosenachweises noch kein Spektralphotometer zur Verfügung, mit dem ich den Adeningehalt in den verwendeten Eluaten hätte quantitativ erfassen können. So wurde die zur Pentosebestimmung verwendete Menge ATP bzw. ADP oder AMP nur nach der Intensität der Absorptionsflecken auf dem UV-Photo grob abgeschätzt. Trotzdem wurden bei der Ribosebestimmung erstaunlich gut die bei mehreren Eluaten relativ unterschiedlichen ATP-Mengen entsprechend wiedergefunden. Bei Eluaten von authentischer ATP wurde im ATP-Fleck und AMP-Fleck auf diese Weise die Ribose nachgewiesen. Beim Algenextrakt dagegen liegt am Ort der ATP, wie die Zuckerfärbungen der Chromatogramme gezeigt hatten, überdeckend eine Hexose und eine Pentose (vgl. Abb. 9, I a). Der Beweis des Pentosegehaltes wurde deswegen in erster Linie mit Eluaten vom AMP-Fleck durchgeführt. Bei Butanol-Essigsäure-, wie auch bei Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen ließ sich *der Ribosenachweis für den Algen-AMP-Fleck eindeutig* durchführen.

Eluate vom ATP-Fleck des Algenextraktes gaben ebenfalls eine tiefe Grünfärbung, die hier von der ATP plus der überdeckenden Pentose herrühren kann. Die Konzentration dieser die ATP überdeckenden, freien Pentose kann man an Hand der Färbungsintensität eines Parallelchromatogrammes mit reiner d-Ribose abschätzen. Eluiert man nun entsprechende Parallelproben, so gibt Pflanzen-ATP plus überdeckender Pentose einen eindeutig viel höheren Pentosewert als die reine d-Ribose. Dieser erhöhte Pentosegehalt beim Eluat des Algen-ATP-Fleckes dürfte von der hier vorliegenden ATP herrühren.

e) UV-Absorptionsspektrum. Um die im UV-Licht bei 260 mμ absorbierende Komponente des Algenextraktes als Adenin gegenüber anderen absorbierenden Basen zu identifizieren, wurde das UV-Absorptionsspektrum aufgenommen. Der Algenextrakt und die authentischen Vergleichssubstanzen wurden chromatographiert, die Lage der Flecken

nach der Chromatogrammentwicklung im gefilterten UV-Licht ermittelt und mit aqua dest. oder n/10 NaOH in gleicher Weise wie zur Pentosebestimmung eluiert.

Nach HOTCHKISS (1948) unterscheiden sich die Purin- und die Pyrimidinbasen bzw. deren Riboside in ihrer Absorption außer in ihren Maxima noch besonders durch die charakteristische Verschiebung der Maxima in verschiedenen p_H-Bereichen. Allein an den Maxima ließen sich z. B. Adenin und Adenosin im neutralen Bereich, Maximum 260 mμ, nicht unterscheiden. Ebenso haben Hypoxanthin und Uridylsäure (THOMAS, HERSHEY, ABBATE und LOUFBOUROW 1952) im Alkalischen beide ihr Maximum bei 262 mμ. In dieser Untersuchung wurden die Spektren des gleichen Eluates deswegen hintereinander neutral, alkalisch und sauer aufgenommen.

Leider zeigten die Eluate in aqua dest. einen recht beträchtlichen Absorptionswert der Leerkontrollen (insbesondere in dem Isobuttersäuregemisch), der bei geringem Gehalt an Basen zu einer Verschiebung des Absorptionsmaximums führen kann. Dieser Papierleerwert zeigt ebenfalls eine p_H-abhängige Verschiebung seines Maximums. Es war also eine sehr genaue Bestimmung des Leerwertes erforderlich, und so wurde stets die fragliche Substanz und die dazugehörige Leerkontrolle im Viererküvettensatz des Spektralphotometers gegen aqua dest. gemessen. Auf diese Weise war auch die Papierleerwert-Absorptionskurve genau bekannt und konnte nun vom Meßwert rechnerisch subtrahiert werden. So wurde bei geringem Gehalt der fraglichen Substanz im Eluat eine fehlerhafte Verschiebung des Maximums durch einen hohen Papierleerwert besser erkannt. Der Viererküvettensatz erlaubte es ferner, zwei Substanzen, z. B. authentische ATP im Vergleich zur Algen-ATP mit einer gemeinsamen Papierleerkontrolle gegen aqua dest. zu messen. Selbstverständlich wurde streng darauf geachtet, daß die Flecken der fraglichen Substanzen und die der Leerwerte vom gleichen Chromatogramm, in gleicher Höhe und von gleicher Größe entnommen wurden. Bei einem Teil der Messungen wurde in n/10 NaOH eluiert, der Papierleerwert ist dabei kleiner und die Basen gehen besser in Lösung. Hier wurde dann nur im Alkalischen und im Sauren gemessen; auf eine genaue Einstellung des Neutralpunktes mußte verzichtet werden, da dieses eine zu starke Verdünnung des wenige ml betragenden Eluates bedingt hätte.

Um die einzelnen Messungen besser vergleichen zu können, wurden die Maxima der Absorptionskurven jeweils gleich 1 gesetzt, die so umgerechneten Kurven zeigt die Abb. 10a für die Messungen im Neutralen, Alkalischen und Sauren für Adenin.

So gewonnene Absorptionskurven der Eluate von authentischen Basen zeigen volle Übereinstimmung mit den von HOTCHKISS angegebenen Daten, wie Abb. 10 für Adenin, Guanin, Uracil und Hypoxanthin als Beispiel zeigt.

Die reinen Basen haben gegenüber ihren Ribosiden unterschiedliche Maxima, zum Beispiel:

	alkalisch	neutral	sauer
Adenin	268 mμ	260 mμ	262 mμ
Adenosin	260 mμ	260 mμ	257 mμ

Während also Adenin eine stärkere Verschiebung zwischen alkalisch und neutral zeigt, liegt diese bei Adenosin, ebenso wie bei AMP, ADP und

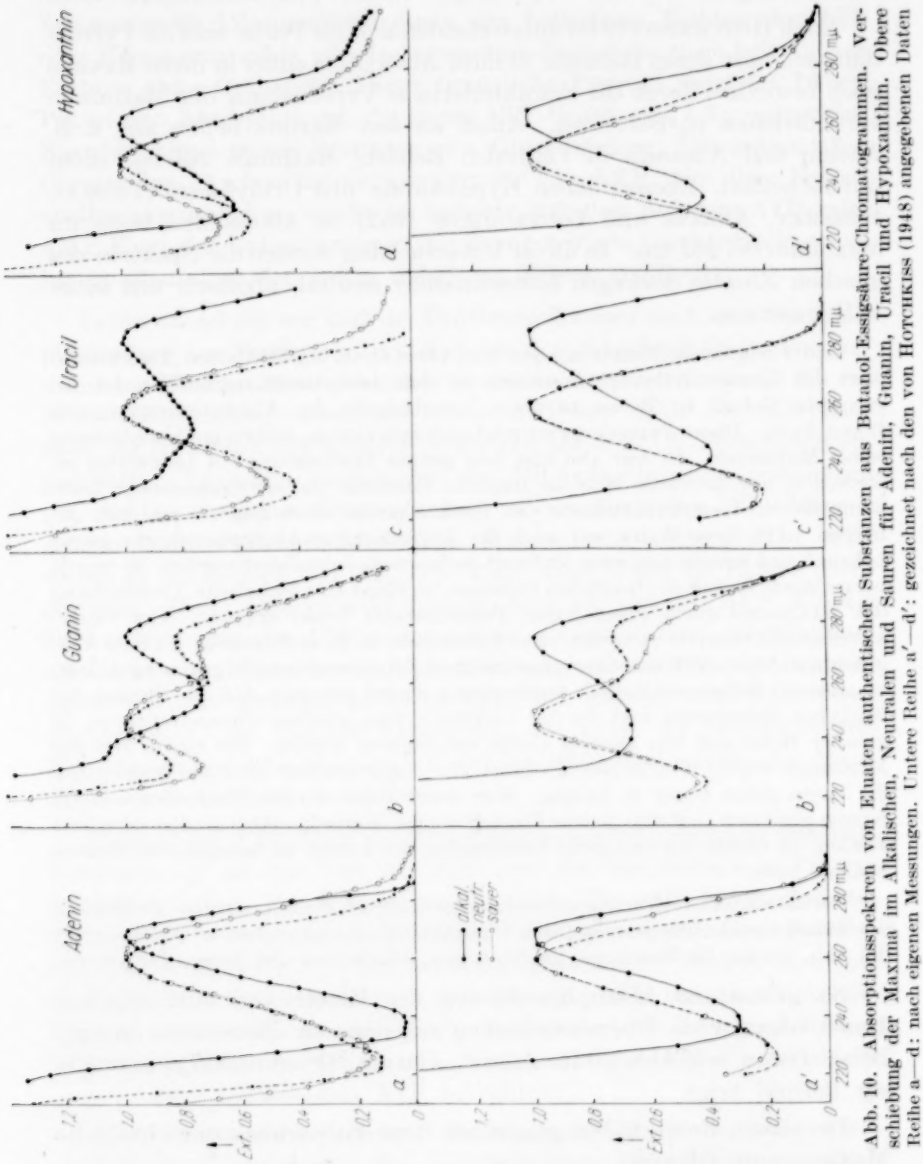

Abb. 10. Absorptionsspektren von Eluaten authentischer Substanzen aus Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen. Verschiebung der Maxima im Alkalischen, Neutralen und Sauren für Adenin, Guanin, Uracil und Hypoxanthin. Obere Reihe a—d: nach eigenen Messungen. Untere Reihe a'—d': gezeichnet nach den von HOTCHKISS (1948) angegebenen Daten

ATP zwischen neutral und sauer. Da das Hydrolyseprodukt bei authentischer ATP und Algen-ATP dem R_f-Wert nach Adenin ist (s. S. 184), so wurden Absorptionsspektren von Eluaten der UV-Flecken sowohl

von hydrolysierter als auch von nicht hydrolysierter ATP und Algenextrakt nach chromatographischer Trennung aufgenommen. Abb. 11 zeigt die erhaltenen Absorptionskurven für authentische ATP und Algenextrakt vor und nach 7 Min.-Hydrolyse. Die Übereinstimmung ist eindeutig.

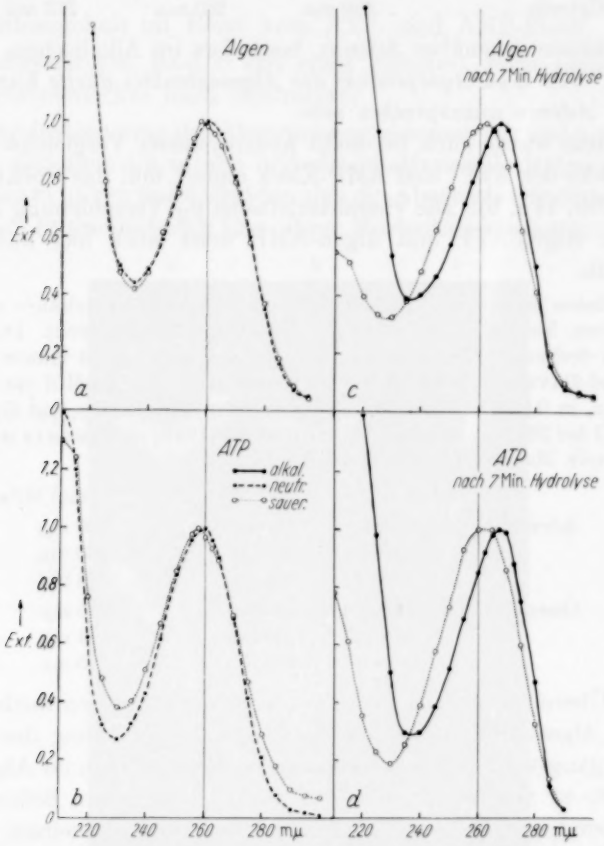

Abb. 11. Vergleich der Absorptionsspektren von authenischer ATP und Algenextrakt. Charakteristische Maximumverschiebung im alkalischen, neutralen und sauren Bereich. Eluate aus einem Butanol-Essigsäure-Chromatogramm, absteigend, 24 Stdn. a und b ohne Hydrolyse, c und d 7 Min.-Hydrolyse

Vergleicht man die Absorptionskurven des hydrolysierten Algenextraktes mit denen von Uracil, Guanin und Hypoxanthin (Abb. 10), so unterscheiden sich diese ganz eindeutig in ihren Absorptionsspektren und liegen im Algenextrakt hiernach nicht vor. Ebenso scheidet

	alkalisch	neutral	sauer
Thymin	290 mμ	265 mμ	265 mμ

aus. Da mir selbst weitere authentische Basen leider nicht zur Verfügung standen, kann ich mich für Xanthin und Cytosin nur auf die Literaturangaben beziehen. HOTCHKISS gibt folgende Maxima für:

	alkalisch	neutral	sauer
Xanthin	285 mμ	270 mμ	265 mμ
Cytosin	280 mμ	265 mμ	275 mμ

Die Differenzen gegenüber Adenin, besonders im Alkalischen, sind also sehr groß. *Das Hydrolyseprodukt des Algenextraktes dürfte hiernach eindeutig als Adenin anzusprechen sein.*

Außerdem wurde auch bei nicht hydrolysierter Vergleichs-ATP und Algenextrakt der ATP- und AMP-Fleck eluiert und das Spektrum verglichen (Abb. 11 a, b). Die charakteristische p_H-Verschiebung des Spektrums der Algen-ATP und Algen-AMP weist auch hier auf Adeninriboside hin.

Am nächsten liegen noch die Absorptionsmaxima von Uridylsäure mit 262 mμ im Alkalischen, Neutralen und Sauren (THOMAS und Mitarb. 1952). Die Angaben der Maxima decken sich bei verschiedenen Autoren leider nicht immer. CROSBIE, SMELLIE und DAVIDSON (1953) geben für Uridylsäure in 0,1 n HCl ein Maximum bei 260,5 mμ, in 0,01 n HCl bei 260 mμ an und für Adenylsäure und Guanylsäure in 0,01 n HCl bei 260 mμ, während bei HOTCHKISS (1948) und THOMAS und Mitarb. (1952) folgende Maxima angegeben werden:

		HOTCHKISS	THOMAS und Mitarb.
Adeninribosid	alkalisch	260 mμ	260 mμ
	neutral	260 mμ	260 mμ
	sauer	255 mμ	258 mμ
Guaninribosid	alkalisch	265 mμ	255 mμ
	neutral	250 mμ	254 mμ
	sauer	255 mμ	255 mμ

Diese Übereinstimmung der Absorptionsspektren von authentischer ATP und Algen-ATP, besonders die kleine Verschiebung der Maxima beim Übergang vom neutralen zum sauren Bereich auch im Algen-ATP-Eluat, läßt es zusammen mit den vorher genannten Befunden aus Papierchromatographie und Hydrolyse gesichert erscheinen, daß *im Algenextrakt am ATP- und AMP-Fleck des UV-Photos ein Adeninribosid vorliegt.*

Die *qualitativen Untersuchungen an Ankistrodesmus* können also dahingehend zusammengefaßt werden:

Im Alkoholextrakt der Algen konnte in Parallelversuchen mit authentischer ATP nachgewiesen werden:

a) Übereinstimmung mit den R_f-Werten von ATP und ADP und deren Spaltprodukt AMP,

b) gleiche Absorptionseigenschaft im gefilterten UV-Licht,

c) keine Überlagerung des Algen-ATP-Fleckes durch ebenfalls im UV-Licht bei 260 mμ absorbierende Aminosäuren, Peptide oder DPN,

d) Phosphatgehalt im ATP-, ADP- sowie auch im AMP-Fleck,

e) Auftreten von Adenin als Hydrolyseprodukt nach 7 Min.-Hydrolyse in 1 n HCl bei 100° C,

f) langsamer Übergang von ATP über AMP bis zu Adenin bei abgestufter Hydrolysestärke,

g) Pentosegehalt im Eluat vom ATP- und AMP-Fleck,

h) Auftreten von Ri-5-P und eines weiteren, noch nicht identifizierten Pentosefleckes nach Hydrolyse,

i) Übereinstimmung des Absorptionsspektrums vor und nach Hydrolyse, d. h. also auch des zucker- und phosphatfreien Hydrolyseproduktes. Im Gegensatz hierzu unterscheiden sich die Absorptionsspektren anderer Purin- und Pyrimidinbasen bzw. ihrer Nucleotide eindeutig.

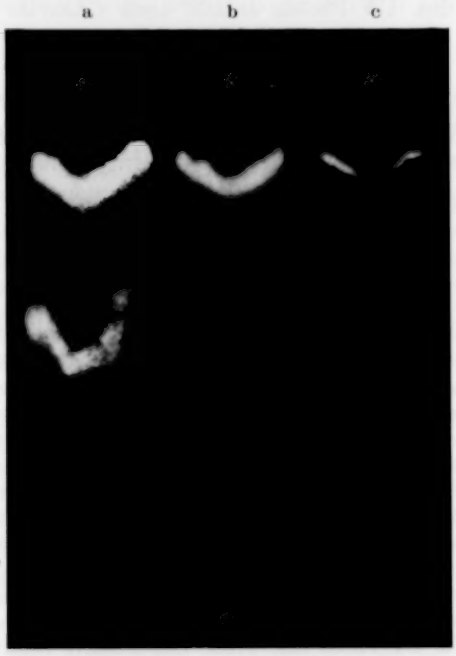

Abb. 12. Vergleich von Aethanolextrakten verschiedener Pflanzen, a *Ankistrodesmus*, b *Chlorella*, c *Helodea*. UV-Photo, Butanol-Essigsäure, absteigend, 48 Stdn.

II. ATP-Nachweis in anderen Pflanzen

1. Chlorella

Unter den gleichen Kultur- und Extraktionsbedingungen wie bei *Ankistrodesmus* wurde auch der Alkoholextrakt von *Chlorella pyrenoidosa* auf ATP-Gehalt untersucht. Abb. 12 zeigt das UV-Photo eines Butanol-Essigsäure-Chromatogrammes, bei dem auf dem Startfleck

a) Alkoholextrakt von *Ankistrodesmus*, auf dem Startfleck b) Alkoholextrakt von *Chlorella* aufgetragen wurde, und zwar wurden beide je 12mal eingetrocknet. Der R_f-Wert beim *Chlorella*-Extrakt stimmt mit dem des *Ankistrodesmus*-Extraktes bzw. authentischer ATP überein. Dabei trat stets auch AMP auf. *Chlorella* enthält bei der hier benutzten Aufarbeitung pro Frischgewicht relativ weniger ATP als *Ankistrodesmus*, was sich auf mehreren Chromatogrammen und beim Vergleich mehrerer Extrakte immer wieder zeigte. Das UV-Photo Abb. 12 läßt den Mengenunterschied deutlich erkennen. Das gleiche Chromatogramm wurde auch mit Ninhydrin auf Aminosäuren angefärbt. Die Ninhydrin-Färbung zeigt eindeutig, daß hier keine Aminosäuren oder Peptide die Absorptionsflecken auf dem UV-Photo verursachen. *Nach der Übereinstimmung der R_f-Werte* von *Chlorella*-Extrakt, *Ankistrodesmus*-Extrakt und authentischer ATP auf den UV-Photos *enthält auch Chlorella ATP.*

2. Helodea

Während beim Alkoholextrakt von *Chlorella* mit den methodischen Erfahrungen, die bei den Arbeiten mit *Ankistrodesmus* gesammelt wurden, die absorbierenden Flecken im UV-Licht von 260 mμ sofort sichtbar wurden, war dieses bei Extrakten von *Helodea densa* zuerst nicht der Fall.

Die von abgezupften *Helodea*-Blättern mit 10% TES und 83% Aethanol gewonnenen Extrakte — die Blätter wurden im kleinen Becherglas mit dem Extraktionsmittel bedeckt, gut geschüttelt, bis keine Luftblasen mehr aufstiegen und drei Stunden im Kühlschrank stehengelassen, dann der Extrakt abdekantiert und durch Blaubandfilter filtriert — ließen zunächst keine UV-absorbierenden Flecken auf dem Chromatogramm erkennen. Es wurde dann auf verschiedenen Wegen versucht, den Aethanolextrakt einzuengen. Im Vakuum-Exsikkator erwies sich als Trockenmittel Phosphorpentoxyd weit günstiger als konzentrierte Schwefelsäure. Schonend, aber sehr viel zeitraubender ist die Einengung im warmen Luftstrom von etwa 25° C, bei der der Aethanolanteil langsam verdampft. Außerdem wurde die Vakuumdestillation angewendet. Bei starker Einengung tritt im Alkoholextrakt schließlich eine Trübung auf. Mit authentischer ATP als Modellsubstanz wurden diese Einengungswege ebenfalls durchgeführt, um eine eventuell dabei stattfindende Spaltung der ATP zu prüfen. Die ATP-Lösungen gaben dabei keine Veränderungen; die Chromatogramme zeigten alle etwa das gleiche Spaltungsverhältnis von ATP zu AMP, soweit das UV-Photo eine grobe quantitative Schätzung zuläßt. Bei *Helodea* treten nun im Gegensatz zu den Algenextrakten die störenden Substanzen, die ein Schleppen bei der Chromatogramm-Entwicklung verursachen (vergl. S. 180) in sehr viel größeren Mengen gegenüber dem geringen ATP-Gehalt auf. Da angenommen wurde, daß es sich bei den störenden Substanzen um höhermolekulare Stoffe handelt, so wurde gegen Wasser dialysiert (48 Stunden bei 5° C) und die aqua dest.-Fraktion erneut im Vakuum eingeengt und dann chromatographiert. Die ATP ist gut dialysabel und gibt nach Dialyse und Einengung im Vakuum das normale UV-Bild. Leider durchdringen auch die störenden Substanzen des *Helodea*-Extraktes den Dialyseschlauch. Auch bei mehreren Versuchen mit kürzerer Dialysezeit fanden sich in der dialysierten Fraktion immer noch diese Störsubstanzen. Ich ging dann dazu über, den Aethanolextrakt im Vakuum-Exsikkator über Phos-

phorpentoxyd nur auf $^1/_4$ des Volumens einzuengen und diesen verschieden häufig auf dem Startfleck einzutrocknen; so stellte ich nebeneinander auf dem Chromatogramm eine Reihe von Startflecken mit abgestufter, nur langsam steigender Konzentration her. Hiermit konnte die Größenordnung der Einengung ermittelt werden, bei der einerseits eine gute Trennung noch gewährleistet ist — getestet mit Ninhydrinfärbung — und bei der andererseits der UV-absorbierende Fleck so gut wie möglich sichtbar wird.

Abb. 12 zeigt in Spalte c) ein UV-Photo von *Helodea*-Extrakt. *Danach enthalten auch Helodea-Blätter ATP.* Auf diesem einmal ausgearbeitetem Wege konnte aus weiteren *Helodea*-Pflanzen dann ein solches UV-Photo mehrfach reproduziert werden. Ninhydrinfärbungen zeigten auch für *Helodea*-Extrakt, daß keine Überlagerung von Ninhydrin-positiven Flecken mit den ATP- und AMP-Flecken vorliegt. Im Gegensatz zu den Algenextrakten enthält der *Helodea*-Extrakt noch mehrere bei 260 mμ absorbierende Substanzen mit größerem R_f-Wert als ATP und AMP.

3. Spinacia und Viola

In gleicher Weise hergestellte Extrakte mit 10% TES und 83% Aethanol und auch mit heißem, absolutem Aethanol und anschließender aqua dest.-Extraktion aus Blättern von *Spinacia* und *Viola* gaben keinen ATP-Gehalt zu erkennen. Bei vollständiger Trennung der Substanzen bei der Chromatogramm-Entwicklung sind am Ort der ATP keine absorbierenden Flecken sichtbar. Konzentriert man den Extrakt stärker, so verwischen sich überlagernde Substanzen das Bild. Auch Extrakte aus Homogenisaten von Blättern (homogenisiert in 20% und 10% TES, 80%, 90% und absolutem Aethanol, dann vom Satz abzentrifugiert, das Überstehende durch Blaubandfilter filtriert) zeigten bei der Chromatogramm-Entwicklung *keine Absorptionsflecken am Ort der ATP.* Während bei *Helodea*-Blättern gerade noch eine Sichtbarmachung der ATP bei papierchromatographischer Trennung des Gesamtextraktes erreicht wird, scheinen nach vorliegenden Vorversuchen bei Blättern von *Spinacia* und *Viola* vor der Papierchromatographie Vortrennungen des Gesamtextraktes erforderlich.

B. ^{32}P-Einlagerung in Ankistrodesmus

In Vorversuchen mit ^{32}P-Einlagerung in *Ankistrodesmus* und *Helodea*-Blätter zeigte sich, daß die Gesamtaufnahme an ^{32}P in die Verbindungen der alkohol- oder TES-löslichen Fraktion bei den Algen sehr viel größer ist, was auf einer höheren Stoffwechselintensität der Algen beruhen dürfte. Autoradiogramme von *Helodea*-Extrakt lassen zwar mehrere ^{32}P-Flecken erkennen, u. a. auch im Bereich der ATP. Die ^{32}P-Aktivität war bei *Helodea* aber so gering, daß die Frage der unterschiedlichen Einlagerung in Licht und Dunkel quantitativ nur an *Ankistrodesmus* weiter verfolgt wurde.

1. Zur Methode der ^{32}P-Einlagerung

Zur Einlagerung von radioaktivem Phosphor wurden die Algen am Tage vorher von der Nährlösung abzentrifugiert, dreimal mit aqua dest. gewaschen und dann in einer dichten Suspension (etwa 14 g Algenfrischgewicht/400 ml) in $^{31}PO_4$-freier Nährlösung wieder aufgeschwemmt. Die Algen standen dann bis Versuchsbeginn im Dunkeln und wurden mit Luft, jetzt ohne zusätzliches CO_2, durchlüftet. Diese Verarmung — ohne $^{31}PO_4$, ohne Licht, ohne Zusatz CO_2 — wurde 12 bis 14 Stunden vor der ^{32}P-Einlagerung begonnen. Zur ^{32}P-Einlagerung befanden sich die Algen in der $^{31}PO_4$-freien Nährlösung in einer Gaswaschflasche, wie sie Abb. 1b zeigt. Oben ist ein Trichter mit Hahn angeschmolzen, durch den die ^{32}P-Lösung hineingegeben wird. Die Aktivität der Einlagerungsnährlösung betrug 120000 Imp./Min./10 ml Nährlösung, p_H 5,1 (7,5 μC). Unten ist ein Schliffhahn angebracht, durch den am Ende der ^{32}P-Einlagerung die Algen in ein graduiertes, nachgeeichtes Zentrifugenglas abgelassen wurden. Bei Versuchen mit 5, 20 und 60 Minuten Einlagerungszeit wurden dann nach 5 Minuten, 20 Minuten etc. je 50 ml Algensuspension abgelassen, während die anderen weiter in der Einlagerungsflasche zirkulierten, so daß hier eine einheitliche Suspension von Algen für die drei verschiedenen Zeitwerte vorlag. Bei Einlagerung im Licht wurde gleichzeitig mit Zugabe der ^{32}P-Lösung das Licht eingeschaltet (Mikroskopierlampen von zwei Seiten, Abstand 10 cm, 3000 Lux, an der Oberfläche der Algen gemessen). Alle Manipulationen vorher — und bei Dunkelversuchen bis zur Fixierung — wurden im Dunkeln bzw. mit so schwacher Lichtintensität ausgeführt, daß die Algen völlig abgeschattet waren. Die abgelassenen 50 ml der Algensuspension wurden mit 4500 Umdr./Min. abzentrifugiert und der Algensatz sofort anschließend im Zentrifugenglas mit 83% Aethanol oder 10% TES fixiert und extrahiert. Anfangs wurden die Algen nach dem Abzentrifugieren der ^{32}P-Nährlösung noch mehrmals mit aqua dest. gewaschen, um das noch außen anhaftende anorganische ^{32}P zu entfernen. Das 1. Waschwasser enthielt noch 400 bis 500 Imp./Min./10 ml Waschwasser, während das 2. bis 6. Waschwasser praktisch gleichbleibend bis etwa 200 Imp./Min./10 ml enthielt. Da das Waschen und Zentrifugieren der Algen mehrere Minuten beansprucht und zwischen Beendigung der ^{32}P-Einlagerung und dem Fixieren natürlich eine möglichst kurze Zeitspanne erwünscht ist, wurde bei späteren Versuchen das Waschen ganz fallen gelassen. Die Menge des ^{32}P im anorganischen Phosphatfleck wurde dementsprechend nicht ausgewertet.

Für den Licht-Dunkelvergleich wurden von einer einheitlichen, in derselben Flasche verarmten Algensuspension im Dunkeln gleiche Mengen für den Licht- und den Dunkelversuch entnommen und in die Einlagerungsflasche umgefüllt, so daß für den Licht-Dunkelvergleich absolut einheitliches Algenmaterial vorlag. Erst nach Regulierung der Durchlüftung wurde ^{32}P bzw. ^{32}P plus Licht gegeben. Der Extrakt wurde dann quantitativ mit 0,1 ml Meßpipetten auf dem Startfleck der Papierchromatogramme aufgetragen.

Die Reproduzierbarkeit der angewandten Extraktions- und Trennungsmethode wurde auf folgende Weise geprüft:

Von einheitlichem Algenausgangsmaterial wurden gleiche Mengen entnommen, unter gleichen Bedingungen, aber als völlig getrennt laufende Versuche, ^{32}P eingelagert, extrahiert, papierchromatographisch getrennt und die Aktivitätskurven bestimmt. Die Übereinstimmung in der Aktivität war eindeutig.

Um bei den Algen irgendwelche tagesrhythmischen Schwankungen des Stoffwechsels auszuschließen, wurden die Versuche zur gleichen Tageszeit angesetzt, d. h. stets über Nacht verarmt und am nächsten Tag zur gleichen Tageszeit ^{32}P eingelagert.

2. *Quantitativ unterschiedliche* ^{32}P*-Einlagerung in verschiedene Verbindungen des Algenextraktes*

Am Ende der papierchromatographischen Trennung und quantitativen Auswertung eines radioaktiven Algenextraktes lag von ein- und demselben Chromatogrammstreifen vor:

1. *Das UV-Photo*, das qualitativ die Lage der ATP bzw. die ihrer Spaltprodukte zu erkennen gibt.

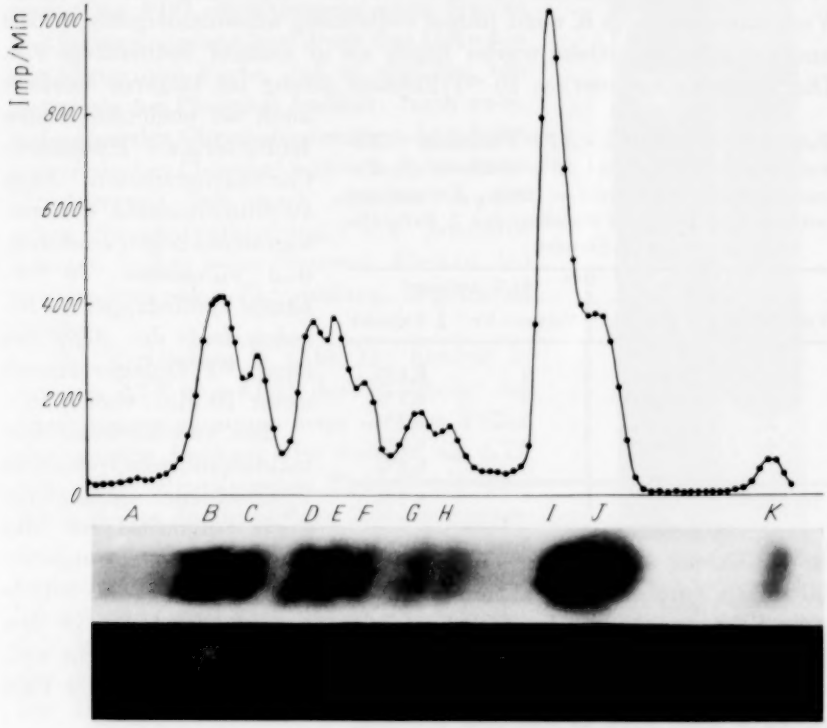

Abb. 13. Radioaktiver Alkoholextrakt von *Ankistrodesmus* papierchromatographisch getrennt: zusammengehöriges UV-Photo, Autoradiogramm und Aktivitätskurve. Butanol-Essigsäure, absteigend, 59 Stdn.

2. *Ein Autoradiogramm*, das die Anzahl und Lage sowie die erreichte Trennschärfe der ^{32}P-haltigen Verbindungen und grob auch die ^{32}P-Aktivität in den einzelnen Verbindungen zeigt. Der Vergleich mit dem UV-Photo ergibt die Lage der ATP auf dem Autoradiogramm.

3. *Die Aktivitätskurve*, die mit dem Abtastgerät (s. S. 174) aufgenommen wurde, gibt die ^{32}P-Aktivität der ^{32}P-Flecken des Autoradiogrammes quantitativ wieder. Abb. 13 zeigt für einen Alkoholextrakt von Algen die Bilder eines derartigen mit Butanol-Essigsäure entwickelten Chromatogrammes (^{32}P-Einlagerung 5 Min. im Licht). Die Aktivitäts-

unterschiede der mit dem Geiger-Müller-Zähler aufgenommenen Kurve werden von dem Autoradiogramm bestätigt.

Diese Chromatogramme zeigen, daß bei Ankistrodesmus in 5 Min. in mindestens 10 Verbindungen ^{32}P eingebaut wird. Die Anzahl der Verbindungen bei Einlagerung im Dunkeln war stets die gleiche wie bei Lichteinlagerung. Die Verbindungen wurden zur vorläufigen Unterscheidung auf Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen mit den Buchstaben A bis K benannt. Bei kürzerer Laufzeit der Chromatogramme sind die Verbindungen A bis K nicht immer vollständig auseinandergezogen. Bei anderen Lösungsmitteln wieder liegen sie in anderer Reihenfolge vor. Die Auftrennung bis zu 10 ^{32}P-Flecken gelang bei längerer Laufzeit auch bei eindimensionalen Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen. Auch zweidimensionale Chromatogramme zeigen eindeutig, daß *mindestens 10 ^{32}P-haltige Verbindungen im Alkoholextrakt der Algen* bei einer ^{32}P-Einlagerungszeit unter 10 Min. vorliegen.

Tabelle 6. *^{32}P-Gehalt des ATP-Fleckes im 2. Extrakt bei 10% TES und 83% Aethanol als Extraktionsmittel. 1. Extrakt = 100%. Extraktionszeit des 1. Extraktes 3 Stunden, des 2. Extraktes 24 Stunden*

10 % TES		83 % Aethanol	
Versuch-Nr.	2. Extrakt	Versuch-Nr.	2. Extrakt
1	46%	1	6,1%
2	47,5%	2	8,7%
3	42%	3	9,2%
4	35%	4	8,6%
—	—	5	8,2%
Im Mittel	42,8%		8,2%

Bei verschiedenen Extraktionsmitteln treten nun Unterschiede qualitativer sowie quantitativer Art im ^{32}P-Gehalt auf. Unter sonst gleichen Algen- und Einlagerungsverhältnissen wurde die Extraktion mittels 83% Aethanols und die mittels 10% TES verglichen. In TES-Extrakten tritt im Gegensatz zu den Alkoholextrakten die Verbindung K (s. Abb. 13) überhaupt nicht auf. Die Verbindung K ist also in 83% Aethanol löslich und in 10% TES unlöslich oder wird in letzterer zerstört.

Ferner wurde bei sukzessiver Extraktion die Aktivität des 2. Extraktes im Vergleich zum 1. Extrakt bei Aethanol- und TES-Extraktion quantitativ verfolgt. Während bei der Alkoholextraktion der allergrößte Teil der Verbindungen im 1. Extrakt erscheint, tritt bei TES-Extraktion noch ein großer Teil im 2. Extrakt auf. Tabelle 6 gibt den ^{32}P-Gehalt des ATP-Fleckes für den 2. Extrakt für Aethanol- und TES-Extraktion wieder. Bei TES-Extraktion enthält der ATP-Fleck des 2. Extraktes noch durchschnittlich etwa 40% des 1. Extraktes. Bei Alkoholextraktion dagegen zeigt der 2. Extrakt im Durchschnitt nur 8,2%. Ähnlich verhalten sich die anderen Verbindungen. Bei mehreren Wiederholungen mit neuen Extrakten zeigten sich diese Unterschiede stets in gleicher Weise wieder. Da bei der Untersuchung der Licht- und Dunkeleinlagerung lediglich relative Unterschiede der ^{32}P-Einlagerung in ATP gesucht

wurden, konnte eine Nichterfassung des 2. Alkoholextraktes mit etwa 10% des alkohollöslichen Anteiles vernachlässigt werden.

Von großem Interesse ist nun die Frage nach der chemischen Identität dieser 10 ^{32}P-Flecken. Bei Verbindung I und J (Abb. 13) handelt es sich, durch Vergleichs- und Cochromatographie mit authentischer Substanz gesichert, um anorganisches Ortho-Phosphat, welches unter den hier benutzten Bedingungen zweiteilig auf Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen auftritt. Das $^{31}PO_4$-Sprühreagens nach HANES und ISHERWOOD bestätigt durch das Auftreten der blaugrünen Farbe, daß es sich hier um anorganisches Phosphat handelt. Nach zweidimensionalen Chromatogrammen liegt beim anorganischen Phosphat wahrscheinlich keine Überlagerung mit noch anderen organischen Phosphatverbindungen vor, jedenfalls konnten bisher keine weiteren Flecken bei zweidimensionaler Entwicklung abgetrennt werden.

Abb. 14. Deckung des ATP-Fleckes mit einem ^{32}P-Fleck, keine Deckung des AMP-Fleckes. UV-Photo mit dem zugehörigen Autoradiogramm, Butanol-Essigsäure, absteigend, 60 Stdn.

Bei Verbindung B (Abb. 13) handelt es sich um ATP plus ADP; das UV-Photo[1] der Algenchromatogramme zeigt in allen Fällen eine genaue Deckung des weißen, als ATP plus ADP identifizierten Fleckes mit dem Fleck B des dazugehörigen Autoradiogrammes. Bei Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen decken sich die zwei weißen Flecken ATP und ADP des UV-Photos ebenfalls beide mit ^{32}P-Flecken. Diese Deckung des ATP- plus ADP-Fleckes mit ^{32}P wurde für Butanol-Essigsäure auf 74 Chromatogrammen, für Isobuttersäure-Essigsäure für die dort getrennten Flecken ATP und ADP auf 55 Chromatogrammen stets gefunden. Auch zweidimensionale Chromatogramme mit Isobuttersäure-Essigsäure/Isobuttersäure-NH_3 stimmten hiermit überein. *Der Einbau von ^{32}P in ATP und ADP dürfte damit gesichert sein.*

Anders verhält es sich bei AMP. In etwa 90% der Fälle ist auch AMP von einem ^{32}P-Fleck (Fleck H der Abb. 13) genau überlagert. In wenigen Fällen aber deckt der ^{32}P-Fleck den weißen Fleck des UV-Photos nicht vollständig, besonders in zwei Fällen lag deutlich keine ^{32}P-Deckung vor (Abb. 14). Diese Abweichungen zeigen, daß hier andere ^{32}P-Verbindungen mit zufällig ähnlichem R_f-Wert die AMP überlagern und

[1] Die UV-Absorption des Fleckes C soll an dieser Stelle nicht näher erklärt werden.

einen ^{32}P-Gehalt der AMP vortäuschen. Da die AMP-Konzentration im Algenextrakt im Vergleich zur ATP-Konzentration sehr gering ist, zeigt das UV-Photo den AMP-Fleck oft nur gerade noch an der Grenze des Erkennbaren, was einen eindeutigen Vergleich mit den viel deutlicher hervortretenden ^{32}P-Flecken nicht immer zuläßt.

Die Identifizierung der anderen ^{32}P-Flecken wurde im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht weiter ausgeführt.

Weiter war die Frage zu lösen, welche anderen Phosphatester die ATP mit einem ähnlichen R_f-Wert überlagern. Dazu wurde mit den zur Verfügung stehenden authentischen Vergleichssubstanzen und den zwei hauptsächlich benutzten Lösungsmitteln Butanol-Essigsäure und Isobuttersäure-Essigsäure wiederholt Vergleichschromatographie durchgeführt. Die authentischen Substanzen wurden mit dem $^{31}PO_4$-Sprühreagens nach HANES und ISHERWOOD sichtbar gemacht und mit dem Autoradiogramm und UV-Photo der parallel gelaufenen Algenextrakte verglichen.

Daraus ergibt sich für Butanol-Essigsäure-Chromatogramme: Einen kleineren R_f-Wert als ATP hat eindeutig Meta-P (Abkürzungen s. S. 167). Den gleichen, eher etwas kleineren R_f-Wert — Differenz aber bisher nicht gesichert — hat Fr-1,6-P. Mit etwas, aber eindeutig größerem R_f-Wert folgen Gl-1-P, Gl-6-P, Fr-6-P, Pyro-P, mit noch größerem R_f-Wert folgt Ri-5-P und dann PGS. Der R_f-Wert von PGS erreicht aber noch nicht den ^{32}P-Fleck H auf der Höhe von AMP. Wie wir auf S. 182 schon sagten, liegt bei diesen Butanol-Chromatogrammen dem UV-Photo zufolge noch DPN dem ATP-Fleck parallel. Es könnte jetzt also durch eine Einlagerung von ^{32}P in DPN eine Einlagerung von ^{32}P in ATP vorgetäuscht werden. Zwar sahen wir an Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen, daß im alkohollöslichen Anteil des Algenextraktes DPN nicht im UV-Photo zu finden ist. Da aber die Messung der ^{32}P-Aktivitätsunterschiede der Chromatogrammflecken schon in viel kleinerer Größenordnung anspricht als das UV-Photo, so war eine Störung durch einen ^{32}P-Einbau in DPN zwar unwahrscheinlich, aber für Butanol-Essigsäure-Chromatogramme nicht mit Sicherheit auszuschließen. Bei Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen könnte also der ^{32}P-Gehalt im ATP-plus ADP-Fleck u. a. von einem ^{32}P-Einbau in DPN und Fr-1,6-P überlagert werden.

Für Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogramme liegen die Verhältnisse anders: Auch hier zeigt Meta-P einen eindeutig kleineren R_f-Wert als ATP. Ebenfalls einen gesichert kleineren R_f-Wert hat hier Fr-1,6-P. Einen nur wenig kleineren R_f-Wert als ATP zeigt Pyro-P. Auf der Höhe der ATP mit etwas größerem R_f-Wert, aber keiner gesicherten Differenz, liegen Ri-5-P, Gl-6-P, Gl-1-P, mit etwas größerem R_f-Wert Fr-6-P, aber immer noch mit kleinerem R_f-Wert als ADP. PGS folgt dann mit wenig größerem R_f-Wert als ADP. Bei Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen konnte also bisher eine Störung der Aktivitätsmessung der ATP durch Pyro-P, Ri-5-P und die Hexosemonophosphatester nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

Vergleicht man die Ergebnisse in den beiden Lösungsmitteln, so ergibt sich: Bei Butanol-Essigsäure liegen von den benutzten Vergleichssubstanzen nur DPN und Fr-1,6-P der ATP parallel, bzw. mit nicht gesicherter Differenz im Bereich der ATP. Gerade DPN und Fr-1,6-P liegen aber bei Isobuttersäure-Essigsäure ganz eindeutig

außerhalb des ATP- oder ADP-Bereiches. Treten nun bei unterschiedlichen ^{32}P-Einlagerungsbedingungen auf dem Isobuttersäure-Chromatogramm im Bereich von Fr-1,6-P und DPN keine hohen ^{32}P-Aktivitäten auf und nicht die nach den Butanol-Chromatogrammen mit der Zeit und im Licht und Dunkel zu erwartenden Aktivitätsschwankungen, so ist diese Aktivität dem ^{32}P-Gehalt der ATP zuzuordnen, unter der Voraussetzung, daß hier nicht noch andere, mir nicht zur Verfügung stehende Verbindungen stören.

3. Vergleich von ^{32}P-Einlagerung im Licht und im Dunkel

Das Ziel dieser Untersuchungen war, Unterschiede im ^{32}P-Gehalt — insbesondere der ATP — bei verschiedenen Photosynthesebedingungen festzustellen. Diese Versuche wurden im Sommer 1953 durchgeführt; damals waren noch keine quantitativen Aktivitätsunterschiede im ^{32}P-Gehalt der ATP bei Licht- und Dunkeleinlagerung bekannt. Es wurde hier zunächst der Licht-Dunkelvergleich bei sonst konstant gehaltenen Photosynthesebedingungen, wie CO_2-Gehalt, Lichtintensität und -qualität, Temperatur etc. durchgeführt. In den ersten Versuchen fanden sich bei einer Einlagerungszeit von 2 Stunden hinsichtlich der ATP im Licht und im Dunkel keine wesentlichen Aktivitätsunterschiede. Bei diesem Versuch waren die *Ankistrodesmen* 13 Stunden lang vorher in $^{31}PO_4$-freier Nährlösung verarmt worden, sie waren aber sonst den normalen CO_2-Zufuhr- und Lichtverhältnissen ausgesetzt, d. h. bei gewohnten Photosynthesebedingungen nur auf Phosphat verarmt. Die quantitative Auswertung des 83% Aethanol- und des 10% TES-Extraktes (jeweils nur der 1. Extrakt) gaben für Licht und Dunkel *keine* Unterschiede für den ^{32}P-Gehalt der ATP. In den parallel aufgearbeiteten und chromatographierten TES-Extrakten betrug die ^{32}P-Aktivität der ATP nur 62% im Vergleich zum Alkoholextrakt. Hier tritt die unvollständige Extraktion der ATP im 1. Extrakt bei TES (s. S. 198) wie auch die teilweise Hydrolyse durch die TES-Einwirkung (s. S. 178) also auch im ^{32}P-Gehalt hervor. Es sei hier nochmals darauf hingewiesen, daß es sich bei diesen vier verglichenen Extrakten (Alkoholextrakt, Licht und Dunkel und TES-Extrakt, Licht und Dunkel) um völlig gleiches Algenausgangsmaterial handelt, welches unter konstanten Bedingungen ein und derselben Verarmungsflasche entnommen wurde.

In dem obengenannten Licht-Dunkelversuch wurde nach den zwei Stunden ^{32}P-Einlagerung das Algenmaterial einmal mit aqua dest. zur Entfernung des außen anhaftenden anorganischen ^{32}P gewaschen. Die Zeit für Abzentrifugieren, Waschen und wieder Abzentrifugieren, ebenfalls bei Licht und Dunkel vorgenommen, bis zum Beginn der Extraktion, betrug hier noch 8 Minuten. Diese Zeit kann Unterschiede im ^{32}P-Gehalt wieder verwischen. In den weiteren Versuchen wurde deswegen auf das Waschen verzichtet (s. auch S. 196). Die Zeit bis zum Fixieren konnte auf $4^1/_2$ bzw. später $3^1/_2$ Minuten verkürzt werden.

In weiteren Versuchen wurde nun der Frage nachgegangen: Wie verhält sich der ^{32}P-Gehalt der ATP bei kürzerer Einlagerungszeit und ändert er sich mit der Zeit im Licht und Dunkel gleichermaßen? In dieser Serie wurden die *Ankistrodesmen* 14 Stunden vorher in die $^{31}PO_4$-freie Nährlösung gegeben, jetzt aber während dieser Phosphatverarmung außerdem im Dunkeln gehalten und nur mit Außenluft ohne Zusatz von CO_2 durchlüftet. Als ^{32}P-Einlagerungszeiten wurden 5, 20 und 60 Minuten gewählt. Für die drei Zeitwerte sowie für Licht- und Dunkelproben wurde stets streng vergleichbares Algenausgangsmaterial verwendet. Aus technischen Gründen mußte für diese Versuche auf den Vergleich von TES und Alkoholextraktion verzichtet werden. Es wurde nur Alkoholextrakt hergestellt und — mit wenigen Ausnahmen — nur der 1. Extrakt quantitativ ausgewertet. Abb. 15 zeigt UV-Photo und Autoradiogramm eines Butanol-Essigsäure-Chromatogrammes von einem Licht-Dunkelversuch mit diesen drei Einlagerungszeiten.

a) Unterschiede im ^{32}P-Gehalt der ATP. Die Berechnung der spezifischen Aktivität der ATP aus der gesamten Menge der ATP — bestimmt am Adeningehalt — im Verhältnis zum ^{32}P-Gehalt wurde bisher nicht durchgeführt, da mir damals noch kein Spektrophotometer zur Verfügung stand. Soweit die groben Unterschiede im UV-Photo eine Aussage über den Adeningehalt erlauben, ist die Adeninkomponente der ATP bei 5, 20 und 60 Minuten sowohl im Licht als auch im Dunkeln etwa gleich groß.

Die ^{32}P-Aktivität der ATP bei 5, 20 und 60 Minuten im Licht und Dunkel für den ersten Versuch zeigt Abb. 16, I. Während im Dunkeln ganz eindeutig der ^{32}P-Gehalt der ATP mit der Zeit zunimmt, fällt er im Licht nach 20 Minuten wieder ab bzw. hält sich praktisch auf gleicher Größenordnung. Die einige Monate später durchgeführte Wiederholung dieses Versuches führte zu im Prinzip gleichen Ergebnissen (Abb. 16, II). Auch hier liegt im Licht die Aktivität der ATP bei 5 und 60 Minuten in der gleichen Größenordnung, während sie im Dunkeln mit der Zeit deutlich zunimmt. Bei dem dritten Versuch traten die Aktivitätsunterschiede der ATP anders auf (Abb. 16, III). Hier nimmt im Licht und im Dunkeln die Aktivität mit der Zeit ab, und zwar im Licht stärker als im Dunkeln.

Daß diese Aktivitätsunterschiede tatsächlich im Algenextrakt vorliegen und nicht etwa auf einem bei der papierchromatographischen Auftrennung und quantitativen Auswertung unterlaufenen Fehler beruhen, zeigt als Beispiel für den dritten Versuch die Abb. 17. Extrakte eines Versuches wurden auf drei Chromatogrammen ausgezählt, die Laufzeit und damit der Wanderungsweg vom Startfleck war für alle drei Chromatogramme ein völlig anderer. Außerdem waren auf den verschiedenen Chromatogrammen verschiedene Mengen des Extraktes auf dem Startfleck aufgetragen (0,12 bis 0,24 ml). Abb. 17 zeigt die umgerechneten Maxima der ATP für 5, 20 und 60 Minuten im Licht. Der Aktivitätsabfall geht auf allen drei Chromatogrammen parallel.

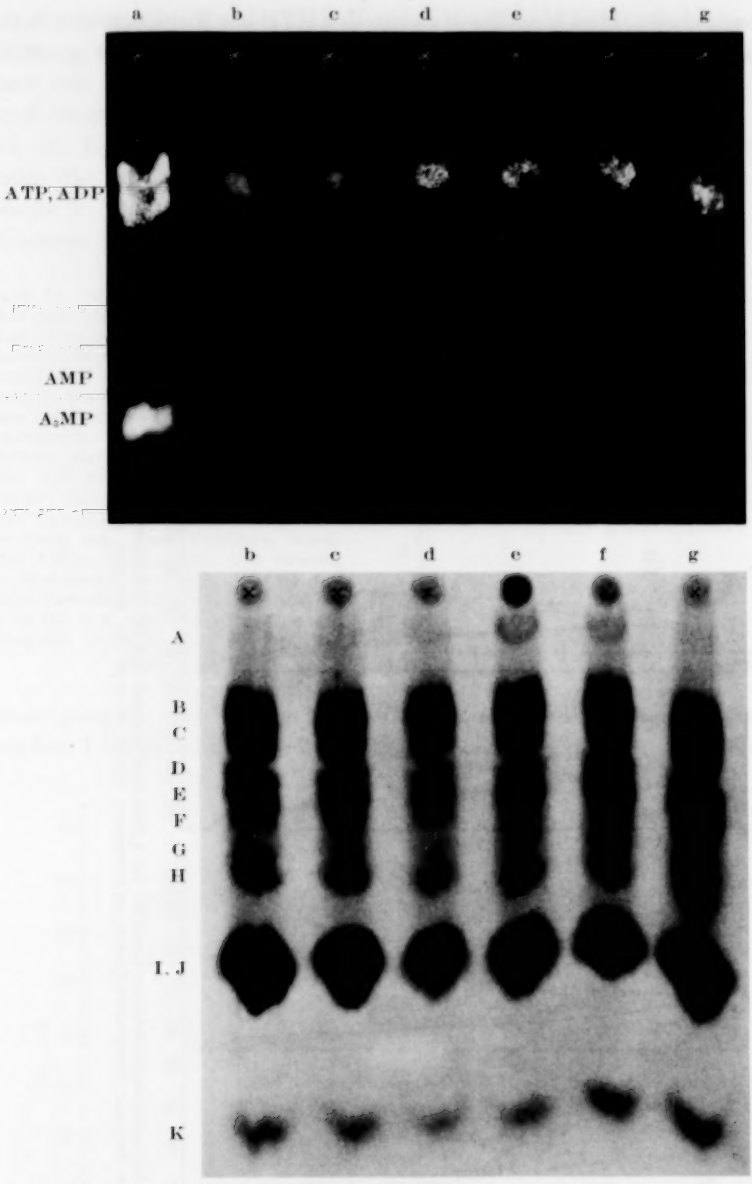

Abb. 15. UV-Photo und Autoradiogramm eines ^{32}P-Einlagerungsversuches. Butanol-Essigsäure, absteigend, 49 Stdn. a Authentische ATP und A_2MP, b—g Algenextrakt (1. Aethanolextrakt), b Licht, 5 Min., c Licht, 20 Min., d Licht, 60 Min., e Dunkel, 60 Min., f Dunkel, 20 Min., g Dunkel, 5 Min.

Um nun die Änderung des ^{32}P-Gehaltes der ATP in den drei Versuchen besser vergleichen zu können, wurden sie in der Abb. 18 noch einmal

zusammengefaßt. Hier sind die Maxima der ATP als Funktion der Zeit eingezeichnet. Die 5 Min.-Werte im Licht wurden gleich 100 gesetzt

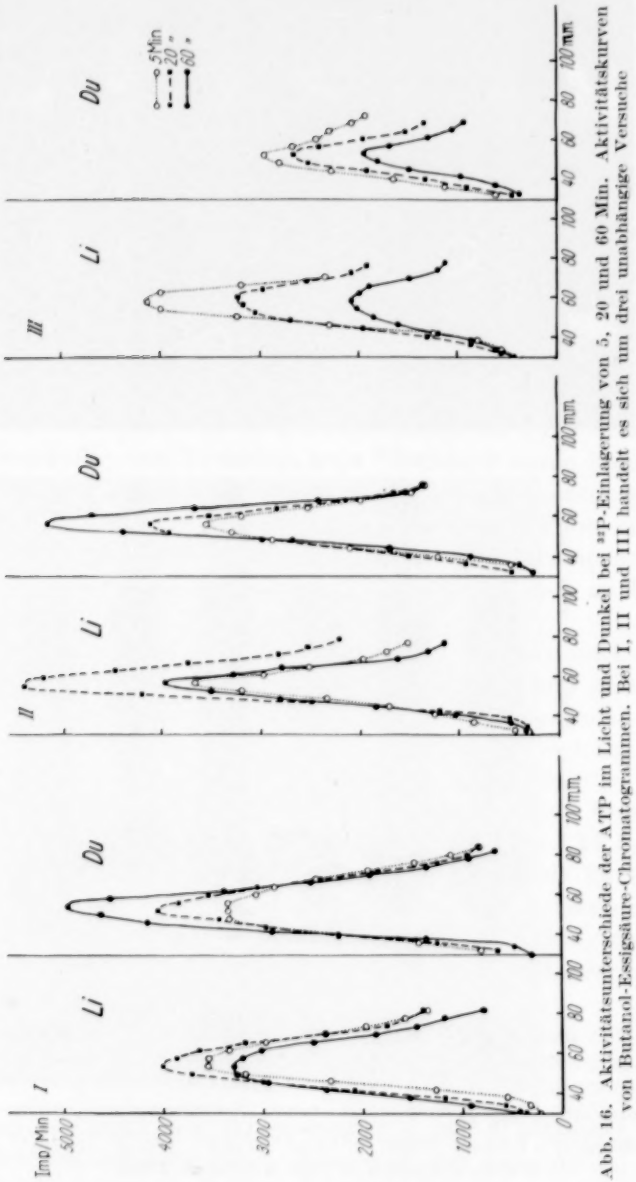

Abb. 16. Aktivitätsunterschiede der ATP im Licht und Dunkel bei ^{32}P-Einlagerung von 5, 20 und 60 Min. Aktivitätskurven von Butanol-Essigsäure-Chromatogrammen. Bei I, II und III handelt es sich um drei unabhängige Versuche

und hierauf die anderen Werte bezogen. Im I. und II. Versuch wird danach im Licht zwischen 5 und 60 Minuten ein Maximum durchlaufen, während im Dunkeln noch bei 60 Minuten ein Anstieg des ^{32}P-Gehaltes

zu verzeichnen ist. Im III. Versuch ist das Aktivitätsmaximum im Licht vor dem 5 Min.-Wert anzunehmen, aber auch im Dunkeln fällt hier die Aktivitätskurve ab, und zwar deutlich langsamer als im Licht. Worauf beruht nun die Differenz der Versuche I und II gegenüber Versuch III? Die Versuchs-

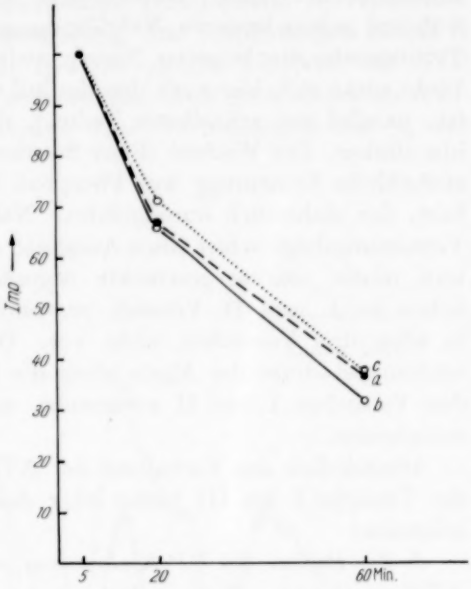

Abb. 17. Methodische Sicherung für den Aktivitätsabfall der ATP mit der Zeit (Versuch III). Vergleich von drei Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogrammen, die verschieden lange entwickelt wurden und verschiedene Mengen des Extraktes auf dem Startfleck enthielten. Die Übereinstimmung der Stärke der Aktivitätsabnahme mit der Zeit schließt Fehler beim Auftragen auf dem Startfleck oder bei der Trennung und quantitativen Auswertung aus. Zum Vergleich wurde der 5 Min.-Wert gleich 100 gesetzt. *a* Absteigend 29 Stdn., 0,12 ml auf dem Startfleck, *b* absteigend 33 Stdn., 0,16 ml auf dem Startfleck, *c* absteigend 35 Stdn., 0,24 ml auf dem Startfleck

bedingungen, die vorangegangene Verarmung etc. waren in den Versuchen I bis III völlig gleich gehalten worden. Nun zeigt *Ankistrodesmus*

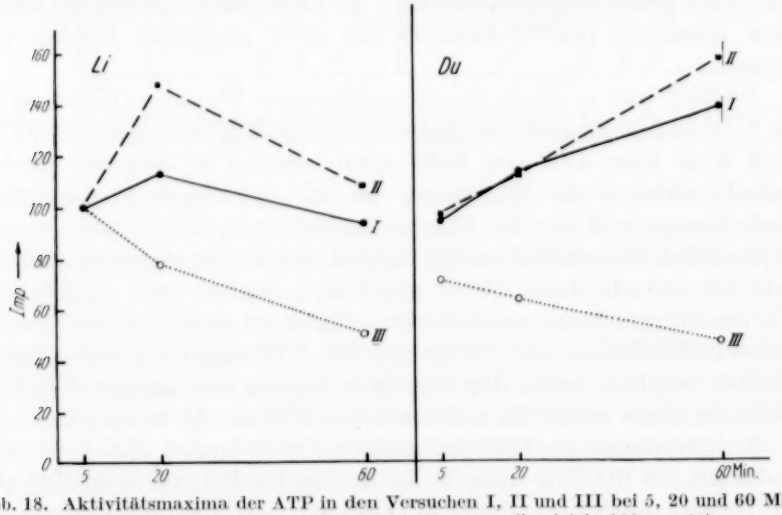

Abb. 18. Aktivitätsmaxima der ATP in den Versuchen I, II und III bei 5, 20 und 60 Min. im Licht und Dunkel. 5 Min.-Licht-Wert jeweils gleich 100 gesetzt

bekanntlich je nach Licht- und Nährlösungsverhältnissen (Pirson, Tichy und Wilhelmi 1951) eine starke Formveränderung, die im Extremfall

zwischen Kugelform und langen, spitzen Nadeln schwanken kann. Diese Formveränderung ist ein Ausdruck eines verschiedenen physiologischen Zustandes der Algen. Reinkulturen auf Agar zeigen runde Stadien, während schon lange in Nährlösung gezogene Algen mit einer hohen Teilungsrate die längsten Nadeln aufweisen. Außer Nährlösung und Licht wirkt sich hier auch der Einfluß der Jahreszeit aus; im Frühjahr ist, parallel zur schnelleren Teilung, die Tendenz zum Nadelstadium hin stärker. Der Wechsel dieser Stadien geht nicht so schnell, daß die einheitliche Verarmung auf Phosphat 14 Stunden vor Versuchsbeginn bzw. der einheitlich durchgeführte Nährlösungswechsel drei Tage vor Verarmungsbeginn hier einen Ausgleich schafft. Im III. Versuch wurden nun relativ stärker gestreckte Algenformen gegenüber mehr rundlichen im I. und II. Versuch protokolliert. Extremfälle lagen aber in allen drei Versuchen nicht vor. Ob dieser Unterschied im Entwicklungsstadium der Algen allein die Differenz des Versuches III zu den Versuchen I und II verursacht, sollen erst weitere Experimente entscheiden.

Hinsichtlich des Verhaltens der ATP bei Licht und Dunkel lassen die Versuche I bis III bisher aber doch schon folgende Verhältnisse erkennen:

1. Zu Beginn der ^{32}P-Einlagerung scheint Licht den ^{32}P-Einbau in ATP zu fördern. Weitere Experimente müssen dieses Ergebnis noch festigen.

2. Der ^{32}P-Gehalt der ATP nimmt im Licht in gleicher Zeit stärker bzw. schon früher ab als im Dunkeln. Im Licht dürfte danach ein schnellerer Austausch des ^{32}P-Gehaltes der ATP gegenüber Dunkel vorliegen.

Wieweit hier a) durch die vorangegangene Phosphatverarmung ein im Licht und im Dunkel verschieden schnelles Auffüllen eines Depots auf dem Wege über ATP eine Rolle spielt, wieweit b) nach der Dunkelperiode während der Verarmung die nun anlaufende Photosynthese (induction-period) hier die Phosphataufnahme beeinflußt oder wieweit c) hier schon Unterschiede erfaßt worden sind, die der stationären Photosynthese (steady-state) direkt angehören, können erst ausführliche, weitere Untersuchungen entscheiden. Sicher ist, daß Licht und Dunkel auf den ^{32}P-Einbau und ^{32}P-Gehalt der ATP einen unterschiedlichen Einfluß ausüben, wobei der schnellere Anstieg und steilere Abfall im Licht für einen schnelleren Umsatz der ATP im Licht spricht.

b) Unterschiede im ^{32}P-Gehalt anderer Verbindungen. Nicht nur ATP verändert mit der Zeit sowie im Licht und Dunkel unterschiedlich den ^{32}P-Gehalt. Auch die anderen ^{32}P-Flecken zeigen interessante Differenzen. Zunächst ist es auffällig, daß fast alle Verbindungen der alkohollöslichen Fraktion mit der Zeit an ^{32}P-Gehalt abnehmen, jedoch einzelne

Verbindungen in ganz verschiedenem Ausmaß (Abb. 19). Auf diese Frage wird in der Diskussion noch näher eingegangen.

Die Abb. 19 zeigt weiter interessante Unterschiede der einzelnen Flecken bei Licht- und Dunkeleinlagerung. Die Verbindungen D und E zeigen im Licht bei 5 Minuten fast die gleiche Aktivität wie ATP (Fleck B), fallen dann aber bis zum 60 Min.-Wert noch steiler als ATP ab. Im Dunkeln dagegen erreichen diese Verbindungen nur $^2/_3$ der

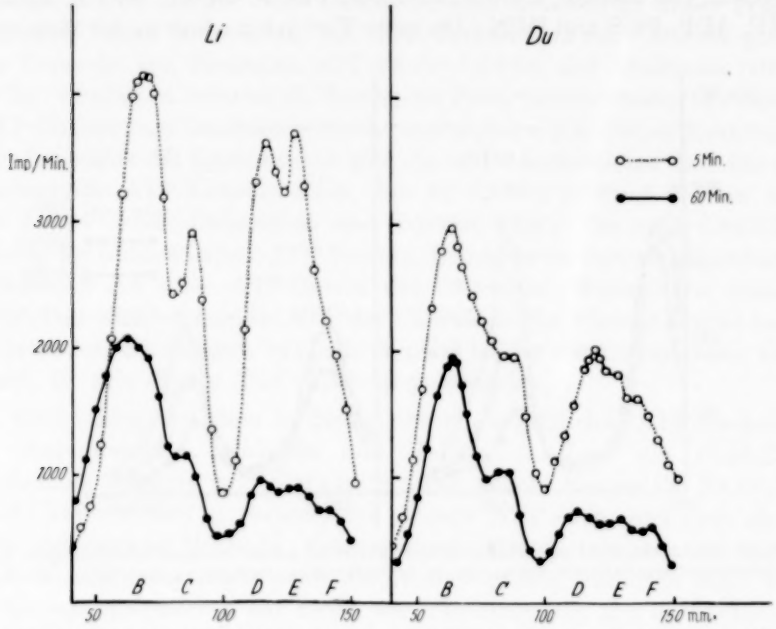

Abb. 19. Vergleich der ^{32}P-Aktivitätsänderungen der Flecken B, C, D, E, F im Licht und Dunkel mit der Zeit. Butanol-Essigsäure, absteigend, 29 Stdn.

ATP-Aktivität beim 5 Min.-Wert. Die 60 Min.-Werte gleichen sich im Licht und Dunkel dann mehr und mehr an. Die Verbindungen D und E werden also noch schneller als ATP zu sekundären Produkten weiter umgelagert. Sie scheinen im Algenstoffwechsel eine aktive Rolle bei der Phosphataufnahme und -verarbeitung zu spielen. Nach Vergleichschromatographie mit den mir zur Verfügung stehenden authentischen Substanzen handelt es sich bei diesen Verbindungen D und E bestimmt *nicht* um PGS, Fr-1,6-P, Meta-P. Dem R_f-Wert-Bereich nach kommen Pyro-P und vor allem die Zuckermonophosphatester in Frage. Ihre Identifizierung ist in unserm Institut in Angriff genommen.

Einen verschiedenen ^{32}P-Einbau und Aktivitätsabfall im Licht und im Dunkel zeigen z. B. auch der erste und zweite Gipfel der Abb. 20. Sie

zeigt die Aktivitätskurven für zwei Substanzen aus einem Isobuttersäure-Essigsäure-Chromatogramm im Licht und Dunkeln für 5, 20 und 60 Minuten ^{32}P-Einlagerung. Die zweite Verbindung zeigt nun im Gegensatz zur ersten Verbindung einen sehr viel stärkeren Aktivitätsabfall. Im Licht ist dieser Aktivitätsabfall fast doppelt so steil als im Dunkeln. Der R_f-Wert-Bereich der beiden Verbindungen liegt nach Vergleichschromatographie mit authentischen Substanzen außerhalb der Bereiche von Meta-P, Pyro-P, Fr-1,6-P, Fr-6-P, Gl-6-P, Gl-1-P, Ri-5-P, ATP, ADP, PGS und DPN. Die erste Verbindung liegt in der Höhe von

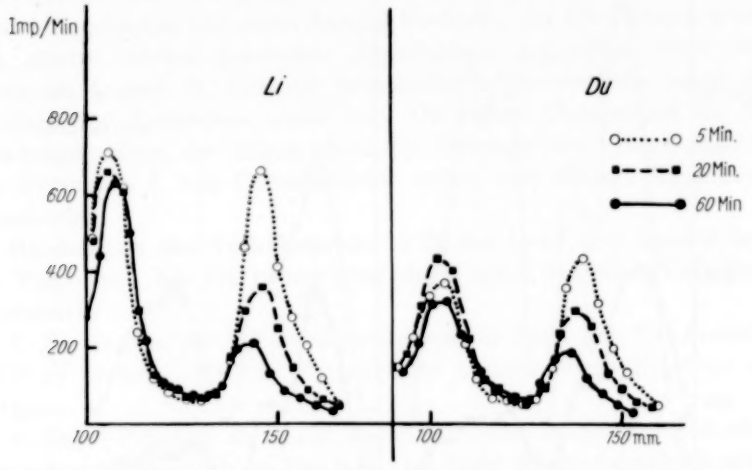

Abb. 20. Licht-Dunkel-Unterschiede in der Aktivität zweier weiterer Verbindungen nach papierchromatographischer Trennung in Isobuttersäure-Essigsäure absteigend, 29 Stdn.

AMP (über die Deckung des ^{32}P-Fleckes mit dem UV-Photo s. S. 199). Bei der zweiten Verbindung handelt es sich um die alkohollösliche, dagegen TES-unlösliche Verbindung (s. S. 198).

Diese Ergebnisse der *^{32}P-Versuche mit verschieden langen Einlagerungszeiten im Licht und im Dunkel bejahen die Frage nach einem unterschiedlichen ^{32}P-Einbau in ATP und zeigen diesen gleichzeitig für noch weitere Verbindungen in der alkohollöslichen Fraktion.* Die mindestens 10 ^{32}P-haltigen Verbindungen zeigen eindeutig einen verschieden hohen ^{32}P-Einbau sowie einen verschieden schnellen Aktivitätswechsel mit der Zeit, was auf unterschiedliche Umsatzgeschwindigkeit der einzelnen Verbindungen im Stoffwechsel der Algen hinweist. Diese verschiedene Umsatzgeschwindigkeit läßt sich durch Licht und Dunkel klar beeinflussen. In weiteren Versuchen ist dieser Fragenkomplex in Einzelfragen aufzugliedern, um die Rolle der ATP und anderer Phosphatverbindungen im Photosynthesestoffwechsel weiter zu klären.

Diskussion

Der erste spezifische Nachweis von ATP in Pflanzengeweben gelang Albaum, Ogur und Hirshfeld 1950 sowie Axelrod und Bandurski 1951 (vgl. Bonner und Millerd 1953) in keimenden mung beans *(Phaseolus aureus)*. Bis vor kurzem fehlte aber noch der qualitative Nachweis in photosynthetisierenden Pflanzenteilen und damit die Beziehung zur Photosynthese. Im Laufe der vorliegenden Untersuchungen erschienen von anderer Seite ebenfalls einige Arbeiten zu dieser Fragestellung. Einen Hinweis auf ein ATP-Vorkommen bei *Chlorella* geben die Versuche von Strehler und Arnold (1951) und Strehler (1951, 1953). Strehler benutzt als Test einen Feuerfliegenextrakt, der durch ATP-Zugabe zum Leuchten gebracht werden kann (Luciferase-Reaktion). Die Intensität der Luminescens gibt ein sehr empfindliches Maß für die vorliegende ATP-Konzentration, bis zu 0,001 γ ATP/ml werden mit 5% Fehler erfaßt (Strehler und Totter 1952). Da auch *Chlorella*, analog der authentischen ATP-Lösung, Luminescens hervorruft, schließt Strehler auf einen ATP-Gehalt der *Chlorellen*. Wieweit bei diesem ATP-Test wirklich nur die ATP der *Chlorellen* oder wieweit andere noch unbekannte Substanzen bzw. die Summe beider die Luminescens auslösen, ist mit diesem Test nicht zu entscheiden.

Gleichzeitig mit dem in dieser Arbeit ausgeführten ATP-Nachweis in *Ankistrodesmus*, *Chlorella* und *Helodea* (s. dazu die vorläufige Mitteilung Simonis und Schwinck 1953) wiesen Goodman, Bradley und Calvin (1953) in *Scenedesmus obliquus* ATP nach, und zwar ebenfalls mit direkter Methode. Goodman und Mitarb. trennten den radioaktiven Pflanzenextrakt papierchromatographisch, eluierten dann und rechromatographierten das Eluat zur Identifizierung mit authentischer Träger-ATP bzw. A_5MP zusammen in einem anderen Lösungsmittel. Die Übereinstimmung des radioaktiven Fleckes auf dem Autoradiogramm mit dem UV-Absorptions-Fleck der Träger-ATP galt als Identifizierung. Durch diese unabhängig voneinander erhobenen, qualitativen Befunde an den Grünalgen *Scenedesmus*, *Ankistrodesmus* und *Chlorella* und weiterhin in den Blättern von *Helodea* dürfte das Vorkommen von ATP in photosynthetisierenden Pflanzen heute als gesichert gelten.

Welche Bedeutung der ATP beim Photosyntheseprozeß zukommt, kann im einzelnen dagegen bis heute noch nicht beantwortet werden. In den letzten Jahren sind mehrere Schemata über den Photosynthesemechanismus unter Einbeziehung einer Energieübertragung durch energiereiche Phosphatverbindungen ($\sim$ph) entwickelt worden, diese sind jedoch noch hypothetischen Charakters (Kandler 1950, Holzer 1951, Goodman und Mitarb. 1953, Strehler 1953, Bassham und Mitarb. 1953, 1954). Die beobachteten Schwankungen im Phosphatspiegel des

umgebenden Nährmediums sowie die Verschiebungen des Phosphatgehaltes einzelner Fraktionen im Pflanzenextrakt nach verschiedenen Photosynthesebedingungen beweisen lediglich die Beteiligung des Phosphathaushaltes, nicht aber der ATP bei der Photosynthese (ARONOFF und CALVIN 1948, GEST und KAMEN 1948, WASSINK und Mitarb. 1950, 1952, 1954, KANDLER 1950, 1954, 1955, SIMONIS und GRUBE 1952, 1953, GRUBE 1953 u. a., Zusammenf. s. PIRSON 1949, 1953, BROWN und FRENKEL 1953, HOLZER 1954). Rückschlüsse auf eine primär oder sekundär lichtabhängige Bildung von ATP oder ~ph waren bisher nur indirekter Natur. So faßt z. B. KANDLER (1954) bei seinen Versuchen mit stark verarmten *Chlorellen* den beobachteten gesteigerten Glucoseeinbau im Licht als Indikator und Maß einer lichtabhängigen Phosphorylierung auf. WASSINK und ROMBACH (1954) schließen von der beobachteten Abnahme des anorganischen Phosphates auf eine Zunahme der sogenannten TES-stabilen Fraktion und vergleichen die getesteten Schwankungen im anorganischen Phosphatspiegel mit den ATP-Kurven, die STREHLER (1953) mit dem Luminescenz-Test erhielt. Außerdem wurden bei zahlreichen Untersuchungen stark saure Extraktionsmittel (z. B. TES) angewandt, die — wie in der vorliegenden Arbeit deutlich gezeigt wurde — irreversible Veränderungen der labilen Phosphatester verursachen und eine falsche Verteilung in die einzelnen Phosphatfraktionen ergeben (s. hierzu auch GOODMAN, BRADLEY und CALVIN 1953, BENSON 1955 u. a.). Die mit diesen einfachen Extraktionsfraktionen erfaßten Schwankungen spiegeln lediglich die Bilanz des Gesamt-Phosphathaushaltes der Zellen bzw. Pflanzenorgane wieder, der sich aus einem ganzen *Komplex* einzelner Reaktionsgruppen im Stoffwechselgeschehen zusammensetzt. Man denke nur daran, daß u. a. die Aufnahme von Glucose oder Phosphat via Zellmembran allein für sich eine komplizierte Fermentreaktion darstellt (ROTHSTEIN 1954, MITCHELL 1954). Auch WINDISCH, HERFURT und RÜHLE (1955) deuten — im Gegensatz zu den früher diskutierten Diffusionsprozessen (GESSNER und KAUKAL 1952) — die Phosphataufnahme in das Zellinnere als eine Phosphorylierungsreaktion auf Grund der Hemmung der Phosphataufnahme durch 2,4-Dinitrophenol. Gegen eine einfache Phosphatdiffusion spricht auch die in den Versuchen von GRUBE (1953) erfaßte Temperaturabhängigkeit der ^{32}P-Aufnahme.

Um auf photosynthetisch hervorgerufene Schwankungen im ~ph oder ATP-Spiegel schließen zu dürfen, ist es nötig, die dissimilatorisch ~ph verbrauchenden oder erzeugenden Prozesse soweit wie möglich konstant zu halten (Lichtatmung-Dunkelatmung siehe u. a. RABINOWITCH 1945, WARBURG 1948, 1951, 1953, 1954, PIRSON 1949, 1953, CALVIN und MASSINI 1952, BROWN und Mitarb. 1952, 1953, GAFFRON und ROSENBERG 1955). Ändert man aber die Atmungsintensität, wie

dieses bei den STREHLERschen Versuchen durch die vorangegangene, lange Anaerobiose und gleichzeitige Licht- plus O_2-Gabe und bei KANDLER (1954) durch die mittels Glucosezugabe zu verarmten *Chlorellen* hervorgerufene Atmungssteigerung der Fall ist, so bedingt diese Atmungsschwankung natürlich ebenfalls Veränderungen des Gesamthaushaltes des ~ph, die im Erscheinungsbild die photosynthetischen Phosphorylierungen überlagern könnten.

Den ersten Beweis für eine lichtabhängige Bildung von ATP brachten die Versuche von OCHOA und VISHNIAC (1952). Chloroplasten inkubiert mit DPN, ADP, $^{32}PO_4$ und Mitochondrien (aus Rattenleber oder *Phaseolus aureus*) ergaben bei Belichtung eine AT^{32}P-Synthese. Diese lichtabhängige ATP-Bildung wurde hier in einem künstlichen System, also in vitro, verfolgt; ob auch in vivo der gleiche Photosyntheseweg beschritten wird, blieb danach eine offene Frage. ARNON und Mitarb. (1954, 1955) ist es kürzlich gelungen, mit isolierten Chloroplasten allein, ohne Zusatz fremder Mitochondrien bzw. Fermente, aus gebotener AMP oder ADP und $^{32}PO_4$ mit Hilfe der Lichtenergie eine AT^{32}P zu erzeugen (photosynthetic phosphorylation). Die Chloroplasten-Präparationen sind außer zur Photolyse des Wassers und dieser Photosynthese-Phosphorylierung auch zur CO_2-Fixierung befähigt. ARNON und Mitarb. verfolgten diese drei Reaktionen unter verschiedenen Photosynthesebedingungen sowie unter Einfluß von Hemmstoffen und Anaerobiose. Als Ergebnis resultiert eine lichtabhängige Phosphorylierung im Anschluß an die Photolyse des Wassers, unabhängig von der CO_2-Fixierung und ohne Ausnutzung der Energie der Reoxydation eines Teiles der reduzierten Produkte der photosynthetischen CO_2-Fixierung. Bei Zusatz von verschiedenen Co-Faktoren (Ascorbinsäure, Riboflavin, Mg^{++} etc.) verläuft die Photosynthese-Phosphorylierung auch anaerob (über anaerobe Phosphorylierung s. auch FRENKEL 1954). Der Zusatz von AMP (bzw. AMP, Glucose, Hexokinase) zu den isolierten Chloroplasten berechtigt auch hier zu dem Einwand, es handle sich nur um eine in-vitro-Reaktion. Aber auch ohne den künstlichen AMP-Zusatz als Phosphatakzeptor erhielt ARNON in einem Versuch eine geringe Photosynthese-Phosphorylierung (0,5% ohne AMP gegenüber 1,8% bei 1 μmol AMP-Zusatz und 25% bei 10 μmol AMP-Zusatz). Die Bestimmung der ATP erfolgte indirekt, erstens durch chromatographische Adsorption und Hydrolyse des labilen Phosphates und zweitens ebenfalls indirekt mit Hilfe des Hexokinase-Systems und quantitativer Bestimmung von Glucose-6-phosphat. Das Ergebnis läßt auf die Anwesenheit einer geringen Menge eines Phosphatakzeptor-Systems innerhalb oder an der Oberfläche der Chloroplasten schließen, so daß ARNON durch den künstlichen Zusatz von AMP die ATP-Synthese lediglich in eine besser faßbare Größenordnung überträgt.

Sprechen nun auch Beobachtungen an lebenden, intakten Zellen für die photosynthetic phosphorylation ARNONs und spielt auch in vivo die ATP die gleiche Rolle wie in den in-vitro-Versuchen? Über Untersuchungen mit lebenden, intakten Zellen oder ganzen Pflanzenorganen und einem direkten ATP-Test berichten außer der hier vorliegenden Arbeit auch noch GOODMAN, BRADLEY und CALVIN (1953) in der Arbeit mit *Scenedesmus*, die mir leider erst nach Abschluß der drei oben beschriebenen Photosyntheseversuche im Januar 1954 bekannt wurde. Auch GOODMAN und Mitarb. verfolgten das Mengenverhältnis der ATP im Licht und im Dunkeln mit Hilfe der ^{32}P-Markierung. Übereinstimmend mit meinen Ergebnissen finden auch sie die schnellste und stärkste Einlagerung von ^{32}P in die ATP im Vergleich zu den anderen ^{32}P-markierten Verbindungen. Während GOODMAN und Mitarb. den $AT^{32}P$-Gehalt in Licht und Dunkel nach 1, 10 und 20 Minuten testen, wurde in der vorliegenden Arbeit nach 5, 20 und 60 Minuten ^{32}P-Einlagerung fixiert (Abb. 16 und 18). GOODMAN und Mitarb. geben bei ihrer Darstellung der Aktivitätskurve der ATP (als Funktion der Zeit aufgetragen in GOODMAN, BRADLEY und CALVIN 1953, Fig. 2) auf der Ordinate nicht die absolute Aktivität, sondern den Prozentgehalt der ATP-Aktivität an der Gesamtaktivität der löslichen, organischen Phosphatverbindungen an. Der Prozentgehalt der ATP-Aktivität an der Gesamtaktivität kann aber abnehmen, während die absolute Aktivität der ATP zunimmt oder auf gleicher Höhe bleibt, also durch eine Änderung der Gesamtaktivität allein ohne Änderung der ATP-Aktivität bedingt sein. (Voraussetzung für den Vergleich absoluter Aktivitätskurven ist natürlich die streng quantitative Entnahme der einzelnen Proben für die verschiedenen Einlagerungszeiten, die meines Erachtens aber durch meine vorn beschriebene Methode gewährleistet ist.) Die prozentualen Aktivitätskurven GOODMANS sind daher nicht unmittelbar mit meinen absoluten Aktivitätskurven zu vergleichen. Der Prozentgehalt der ATP liegt bei GOODMAN und Mitarb. im Dunkeln höher als im Licht und nimmt im Licht sowie im Dunkeln mit der Zeit ab. Diese zeitabhängige, prozentuale $AT^{32}P$-Abnahme ist ohne weiteres verständlich, da ja langsam auch die weniger aktiv am Stoffwechsel beteiligten Substanzen immer mehr mit ^{32}P überschwemmt und damit in die Gesamtaktivität einbezogen werden. Den im Licht geringeren Prozentgehalt der ATP gegenüber Dunkelheit deuten GOODMAN und Mitarb. als einen größeren Bedarf an ATP im Licht und schließen daraus auf eine Funktion der ATP bei der CO_2-Fixierung. Die Betrachtung der absoluten Aktivitätskurven der vorliegenden Arbeit (Abb. 16) zeigt für ATP in den Versuchen I und II schon im Licht einen Aktivitätsabfall, während im Dunkeln die Aktivität noch ansteigt. Bei Versuch III dagegen ist auch im Dunkeln ein Aktivitätsabfall festzustellen, der aber nicht so schnell erfolgt wie

der Abfall im Licht. Der Verlauf der ^{32}P-Aktivitätskurve der ATP in den drei Versuchen läßt vermuten, daß der ^{32}P-Gehalt der ATP zu einem bestimmten Zeitpunkt ein Maximum durchläuft und dann wieder abnimmt. Der Zeitpunkt dieses Maximums und die Steilheit des Aktivitätsabfalles ist dabei durch Licht und Dunkel zu beeinflussen, also photosyntheseabhängig. Andererseits scheint auch der physiologische Zustand der Algen (Nadelstadium der *Ankistrodesmen* etc.) im Licht und Dunkel in gleicher Richtung die Lage des Maximums zu verändern (hierauf weist der Versuch III). Das Durchlaufen eines Aktivitätsmaximums zu einem bestimmten Zeitpunkt zeigen außer ATP auch die anderen ^{32}P-markierten Verbindungen (s. Abb. 19 und 20). Die Höhe des Maximums und der Zeitpunkt, wann dieses erreicht wird, ist für jede Verbindung spezifisch.

Benson, Kawaguchi, Hayes und Calvin (1952) geben für $^{14}CO_2$ steady-state-Photosyntheseprodukte für eine ganze Reihe von identifizierten Verbindungen (PGS, Glucosemonophosphat, Mannose-, Sedoheptulose-, Ribulosephosphat, Äpfelsäure, Glutaminsäure, Alanin u. a.) ganz ähnliche Aktivitätskurven — absolute Aktivität in Abhängigkeit von der Zeit — bekannt, wo ebenfalls, wie bei den ^{32}P-Produkten in meiner Arbeit, die Aktivitätskurve je Verbindung verschieden schnell ein verschieden hohes Maximum erreicht und dann mit unterschiedlicher Steilheit wieder abfällt.

Wie ist dieser Aktivitätsabfall nach einem Maximum nun zu deuten? Theoretisch erwartet man, jedenfalls beim stationären Prozeß, ein in den einzelnen Verbindungen verschieden schnelles Ansteigen der Aktivität bis zu einem Gleichgewichtszustand, der sich als Abflachung der Aktivitätskurve, nicht aber als Abfall, zeigen müßte. Da er auch in meinem Dunkelversuch III auftritt, wo also stationäre Bedingungen vorlagen, so scheint der Abfall nicht auf dem Induktionsphänomen beim Einsetzen der Photosynthese zu beruhen. Der Aktivitätsabfall des ^{32}P-Gehaltes der ATP in der Arbeit Goodman, Bradley und Calvin (1953) ist, wie wir schon oben sahen, nur ein prozentualer zur Gesamtaktivität und braucht deswegen kein absoluter zu sein. Der Aktivitätsabfall bei den $^{14}CO_2$-Versuchen aber (Benson, Kawaguchi, Hayes und Calvin 1952), bei denen die Aktivität der einzelnen $^{14}CO_2$-Produkte von 0 bis 15 Min. verfolgt wurde, ist anders bedingt. Dort wurde nur für 4 Min. genügend $^{14}CO_2$ geboten, so daß nach dieser Zeit eine Abnahme der $^{14}CO_2$-Fixierungsrate einsetzte (nach Benson 1952). Durch das absinkende $^{14}CO_2$-Angebot setzt dort also eine Verdünnung mit $^{12}CO_2$ ein, die zu dem beobachteten Aktivitätsabfall führt, der um so steiler auftritt, je größer die Umsatzgeschwindigkeit der speziellen Verbindung unter den gebotenen Photosynthesebedingungen ist. Im Gegensatz zu diesen $^{14}CO_2$-Versuchen liegt in den ^{32}P-Versuchen der vorliegenden Arbeit *kein*

Mangel im ^{32}P-Angebot vor. Auch nach 60 Min. ^{32}P-Einlagerung war in der Nährlösung der Algen noch eine erhebliche ^{32}P-Konzentration zu verzeichnen. Die im Erscheinungsbild so ähnlichen absoluten ^{14}C und ^{32}P-Aktivitätskurven beruhen also auf völlig verschiedenen Versuchsbedingungen. Gemeinsam aber geben beide durch die unterschiedliche Steilheit im Aktivitätsabfall einer Verbindung eine höhere Umsatzgeschwindigkeit dieser Substanz zu erkennen. Die Ursache des ^{32}P-Aktivitätsabfalles in der vorliegenden Arbeit ist wahrscheinlich in der vorangegangenen Phosphatverarmung zu suchen. Bis zur Auffüllung der Phosphatreservoire steigt die Aktivität der zuerst markierten Verbindungen, darunter auch ATP, an; dabei werden weitere durch die Phosphatverarmung eingeschränkte Kreisprozesse reaktiviert und geben z. T. dann vermehrt anorganisches $^{31}PO_4$ frei. Außerdem wird von den im Anfang markierten Produkten in der alkohollöslichen Fraktion mit der Zeit ein Teil weiter umgebaut und liegt dann in der unlöslichen Fraktion vor, wodurch die Abnahme der Gesamtaktivität der löslichen Fraktion zu erklären ist. Dafür sprechen auch die Versuche von GRUBE (1953), sowie weitere, noch unveröffentlichte Versuche im hiesigen Institut, die einen langsamen Aktivitätsanstieg in der TES-unlöslichen Fraktion gegenüber einer schnelleren ^{32}P-Einlagerung in die TES-lösliche Fraktion ergaben. Die Ursache des ^{32}P-Aktivitätsabfalles wäre also mit anderen Worten: eine Verdünnung des ^{32}P-Gehaltes einer Verbindung durch ^{31}P aus Reserven und Übergang von ^{32}P in die hier nicht weiter analysierten Fraktionen. Während in den ^{14}C-Versuchen von BENSON und Mitarb. die $^{14}CO_2$-Fixierungsrate durch ^{14}C-Mangel zugunsten der $^{12}CO_2$-Fixierung abnimmt, wird in meinen Versuchen die ^{32}P-Aufnahme durch eine Sättigung des Phosphatbedarfes nach Phosphatverarmung wieder reduziert. Wieweit nun die Phosphatverarmung in den vorliegenden Versuchen tatsächlich *allein* veranwortlich ist, müssen noch ausgedehnte Experimente mit Phosphat-steady-state und verschieden starker Phosphatverarmung zeigen.

In Übereinstimmung mit den Versuchen von GOODMAN, BRADLEY und CALVIN (1953), die ebenfalls die Phosphatverarmung anwendeten, deuten auch meine Ergebnisse auf Grund des steileren bzw. früheren Abfalles der ATP-Aktivität im Licht auf eine größere Umsatzgeschwindigkeit des energiereichen Phosphates der ATP während der Photosynthese. Nach den neuen in-vitro-Ergebnissen ARNONS und den Versuchen von GOODMAN, BRADLEY und CALVIN sowie den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit ist eine direkte Beteiligung der ATP an der Photosynthese auch für die lebende Zelle durchaus wahrscheinlich. Da bei der Kompliziertheit der Experimente und Auswertung erst sehr wenige derartige Versuche vorliegen, scheint mir der Zeitpunkt für eine Dis-

kussion der Stellung der ATP in den einzelnen Photosyntheseschemata aber noch verfrüht.

Die Abweichung des dritten ^{32}P-Einlagerungsversuches dieser Arbeit verlangt noch eine weitere Analyse der Einzelfaktoren, die den ATP-Gesamtspiegel bzw. die Intensität der Photosynthese und damit auch die ^{32}P-turnover-Intensität beeinflussen. Weitere Versuche sollen erst die Bedeutung des Phosphatverarmungseffektes, des Einflusses des physiologischen Stadiums der Algen, der steady-state-Bedingungen in bezug auf Licht, CO_2 und O_2 etc. im einzelnen klären. Nach der in vitro gefundenen photosynthetic phosphorylation ARNONs gilt jetzt die Frage der spezifischen Funktion der ATP in der Photosynthese der intakten, lebenden Zelle. Ist spezifisch das Adenylsäuresystem als Energieüberträger erforderlich oder können in vivo auch andere, energiereiche Verbindungen die Lichtenergie weitertransportieren und ATP bzw. AMP oder ADP wäre nur eine dieser Akzeptor- und Transportmöglichkeiten?

Zusammenfassung

1. Die Arbeit berichtet über den Nachweis des Adenylsäuresystems, vor allem ATP, in grünen, zur Photosynthese befähigten Pflanzen. Durch Markierung mit ^{32}P wurde dann eine im Licht und im Dunkel unterschiedlich verlaufende Beteiligung der ATP am Stoffwechsel der Algen aufgefunden.

2. Das Hauptuntersuchungsobjekt war die einzellige Grünalge *Ankistrodesmus braunii* (Nägeli) Brunnthaler. Einige qualitative Identifizierungsschritte wurden auch an *Chlorella pyrenoidosa*, *Helodea densa*, *Viola* und *Spinacia* durchgeführt. Es wurde nur der Aethanol-lösliche bzw. der TES-lösliche Pflanzenextrakt analysiert.

3. Salzsäure-Hydrolyse und fermentative Spaltung mit Apyrase ergaben einen Anstieg des anorganischen Phosphates in der ATP-Lösung sowie auch im Algenextrakt und wiesen somit auf ein ATP-Vorkommen im Algenextrakt hin.

4. Die Papierchromatographie ergab in mehreren Lösungsmitteln übereinstimmende R_f-Werte für authentische ATP und ihre Derivate mit bestimmten Flecken des Algenextraktes.

5. Salzsäure-Hydrolyse mit anschließender, papierchromatographischer Trennung zeigte gleiches Verhalten von authentischer ATP und pflanzlicher ATP. Bei Hydrolyse in 1 n HCl, 100° C, 7 Min. tritt als Hydrolyseprodukt Adenin auf. Mit schwächerer und stärkerer Hydrolyse konnte der Übergang von ATP über ADP, AMP bis zum Adenin verfolgt werden. Adenosin als Zwischenprodukt wurde nicht gefunden.

6. Auf dem Papierchromatogramm zeigt pflanzliche ATP in Übereinstimmung mit authentischen Adenylsäurederivaten im UV-Licht

von 260 mμ die gleiche Absorptionseigenschaft (Photoprintverfahren). Überlagerungen durch ebenfalls bei 260 mμ absorbierende Peptide, Aminosäuren oder DPN konnten ausgeschlossen werden. Mit Hilfe des Absorptionsspektrums bei verschiedenem p_H-Wert konnte die Identifizierung als Adenin bzw. als Adeninnucleotid im Vergleich mit den anderen Purin- und Pyrimidinbasen gesichert werden.

7. Der Phosphatgehalt im ATP-, ADP- und AMP-Fleck des Algenextraktes konnte auf dem Papierchromatogramm nachgewiesen werden.

8. Der Pentosegehalt der pflanzlichen ATP wurde vergleichend mit authentischer ATP nachgewiesen a) durch das Auftreten neuer Pentoseflecken, darunter Ribose-5-phosphat, auf den Papierchromatogrammen nach Hydrolyse und b) durch Pentosenachweis im Eluat vom ATP- und AMP-Fleck.

9. ATP wurde papierchromatographisch auch im Aethanolextrakt von *Chlorella* und *Helodea*-Blättern gefunden. Der Nachweis in *Viola*- und *Spinacia*-Blättern gelang bisher nicht.

10. Bei Einlagerung von ^{32}P in *Ankistrodesmus* erfolgte die quantitative Erfassung der ^{32}P-Aktivität der einzelnen Flecken auf dem Papierchromatogramm mit Hilfe eines zum Geiger-Müller-Zählrohr entwickelten Abtastgerätes. Qualitative und quantitative Unterschiede bei Extraktionen mit 83% Aethanol bzw. 10% TES zeigten die stark hydrolysierende Wirkung der TES auf ATP.

11. Auf den Autoradiogrammen des Algenextraktes treten bei ^{32}P-Einlagerung nach vorangegangener Phosophatverarmung mindestens 10 ^{32}P-Flecken auf.

12. Der unterschiedliche Einbau von ^{32}P in die verschiedenen Verbindungen wurde im Licht- und Dunkelversuch verfolgt. Licht scheint nach vorangegangener Phosphatverarmung die Aufnahme von ^{32}P zu fördern. Bei mehreren Verbindungen nimmt der ^{32}P-Gehalt bei verschieden langer Einlagerungszeit (5, 20, 60 Min.) verschieden schnell wieder ab. Bei einigen Verbindungen ist dieser Abfall im Licht und Dunkel gleich, bei mehreren deutlich unterschieden.

13. Der Einbau von ^{32}P in Algen-ATP und -ADP konnte nachgewiesen werden. Das höchste Maximum der Aktivitätskurve des Extraktes (83% Aethanol) zeigt — abgesehen vom anorganischen Phosphat — die ATP. Der ^{32}P-Gehalt der ATP scheint bei verschieden langer Einlagerung im Licht stärker als im Dunkeln abzunehmen, was für eine schnellere Umlagerung der ATP und ADP im Licht spricht.

14. Neben ATP zeigen zwei weitere Flecken des Autoradiogrammes eine sehr hohe ^{32}P-Aktivität; wahrscheinlich handelt es sich dabei um Zuckermonophosphatester. Diese und weitere ^{32}P-Flecken zeigen ebenfalls Unterschiede bei Einlagerung im Licht und im Dunkel.

Literatur

ALBAUM, H. G.: Annual Rev. Plant Physiol. **3**, 35 (1952). — ALBAUM, H. G., M. OGUR and A. HIRSHFELD: Arch. of Biochem. **27**, 130 (1950). — ALBAUM, H. G., A. SCHATZ, S. H. HUTNER and A. HIRSHFELD: Arch. of Biochem. **29**, 210 (1950). — ARNON, D. I., M. B. ALLEN and F. R. WHATLEY: Nature (Lond.) **174**, 394 (1954). — ARNON, D. I., F. R. WHATLEY and M. B. ALLEN: J. Amer. chem. Soc. **76**, 6324 (1954). — Biochim. et biophysica Acta **16**, 607 (1955). — ARONOFF, S., and M. CALVIN: Plant Physiol. **23**, 351 (1948). — AXELROD, B., and R. S. BANDURSKI: Abstr. Amer. Plant Physiol. **1951**, 28. — BAILEY, K.: Biochemic. J. **45**, 479 (1949) — BANDURSKI, R. S., and B. AXELROD: J. of biol. Chem. **193**, 405 (1951). — BASSHAM, J. A., A. A. BENSON and M. CALVIN: J. chem. Educat. **30**, 274 (1953). — BASSHAM, J. A., A. A. BENSON, L. D. KAY, A. N. HARRIS, A. T. WILSON and M. CALVIN: J. Amer. chem. Soc. **76**, 1769 (1954). — BIELSCHOWSKY, M.: Biochemic. J. **47**, 105 (1950). — BENSON, A. A.: Z. Elektrochem. **56**, 848 (1952). — Methoden der Pflanzenanalyse, von PAECH u. TRACEY, Bd. II, S. 113. Berlin: Springer 1955. — BENSON, A. A., J. A. BASSHAM, M. CALVIN, T. C. GOODALE, V. A. HAAS and W. STEPKA: J. Amer. Chem. Soc. **72**, 1710 (1950). — BENSON, A. A., S. KAWAGUCHI, P. HAYES and M. CALVIN: J. Amer. Chem. Soc. **74**, 4477 (1952). — BONNER, J.: Plant Biochemstry. New York: Academic Press 1950. — BONNER, J. and A. MILLERD: Arch. of Biochem. and Biophysics **42**, 135 (1953). — BROWN, A. H.: Amer. J. Bot. **40**, 719 (1953). — BROWN, A. H., and A. W. FRENKEL: Annual Rev. Plant Physiol. **4**, 46 (1953). — BROWN, A. H., and G. C. WEBSTER: Amer. J. Bot. **40**, 753 (1953). — BURROWS, B., F. S. M. GRYLLS and I. S. HARRISON: Nature (Lond.) **170**, 800 (1952). — CALVIN, M., and P. MASSINI: Experientia (Basel) **8**, 445 (1952). — CRAMER, F.: Papierchromatographie. Weinheim: Verlag Chemie 1953. — CROSBIE, G. W., R. M. S. SMELLIE and J. N. DAVIDSON: Biochemic. J. **54**, 287 (1953). — EMERSON, R. L., J. F. STAUFFER and W. W. UMBREIT: Amer. J. Bot. **31**, 107 (1944). — FLECKENSTEIN, A., E. GERLACH und J. JANKE: Naturwiss. **40**, 462 (1953). — FRENKEL, A. W.: J. Amer. chem. Soc. **76**, 5568 (1954). — GAFFRON, H. and J. ROSENBERG: Naturwiss. **42**, 354 (1955). — GESSNER, F. u. A. KAUKAL: Ber. dtsch. bot. Ges. **65**, 155 (1952). — GEST, H., and M. D. KAMEN: J. of biol. Chem. **176**, 299 (1948). — GOODMAN, M., D. F. BRADLEY and M. CALVIN: J. Amer. chem. Soc. **75**, 1962 (1953). — GRUBE, K.-H.: Planta (Berl.) **42**, 279 (1953). — HANES, C. S., and F. A. ISHERWOOD: Nature (Lond.) **164**, 1107 (1949). — HOLZER, H.: Z. Naturforsch. **6**b, 424 (1951). — Angew. Chem. **66**, 65 (1954). — HOLZER, H., u. F. LYNEN: Liebigs Ann. **569**, 138 (1950). — HORROCKS, R. H.: Nature (Lond.) **164**, 444 (1949). — HOTCHKISS, R. D.: J. of biol. Chem. **175**, 315 (1948). — KALCKAR, H. M.: J. of biol. Chem. **153**, 355 (1944). — KAMEN, M. D. and S. SPIEGELMANN: Cold Spring Habor Symp. Quant. Biol. **13**, 151 (1948). — KANDLER, O.: Z. Naturforsch. **5**b, 423 (1950); **9**b, 625 (1954); **10**b, 38 (1955). — KRISHNAN, P. S.: Arch. of Biochem. **20**, 261, 272 (1949). — LINDEMANN, W.: Proc. Kon. Akad. Wetensch. Amsterd. C **54**, 287 (1951). — LOHMAN, K.: Biochem. Z. **233**, 460 (1932). — LOWRY, O. H., and J. A. LOPETZ: J. of Biol. Chem. **162**, 421 (1946). — LYNCH, V. H., and M. CALVIN: Ann. New York Acad. Sci. **56**, 890 (1953). — MARKHAM, R., and J. D. SMITH: Nature (Lond.) **163**, 251 (1949). — Biochemic. J. **45**, 294 (1949). — MARTLAND, M., and R. ROBISON: Biochemic. J. **20**, 848 (1926). — MEJBAUM, W. Z.: Z. physiol. Chem. **258**, 117 (1939). — MITCHELL, P.: J. gen. Microbiol. **11**, 73 (1954). — NORMAN, R. V. van, and A. H. BROWN: Plant Physiol. **27**, 691 (1952). — OCHOA, S., and W. VISHNIAC: Science (Lancaster, Pa.) **115**, 297 (1952). — PARTRIDGE, S. M.: Nature (Lond.) **164**, 443 (1949). — PIRSON, A.: Fortschr. Bot. **12**, 247 (1949), **14**; 289 (1953). — PIRSON, A., C. TICHY u. G. WILHELMI: Planta (Berl.) **40**, 199 (1952). — RABINOWITCH, E. J.: Photosynthesis and Related Processes,

Bd. I. New York 1945. — Rothstein, A.: Protoplasmatologia, Bd. II, E. 4. Berlin: Springer 1954. — Ruben, S.: J. Amer. chem. Soc. **65**, 279 (1943). — Simonis, W., u. K.-H. Grube: Z. Naturforsch. **7b**, 194 (1952); **8b**, 312 (1953). — Simonis, W., u. L. Schwinck: Naturwiss. **40**, 245 (1953). — Strehler, B. L.: Arch. of Biochem. a. Biophysics **34**, 239 (1951); **43**, 67 (1953). — Strehler, B. L., and W. A. Arnold: J. Gen. Physiol. **34**, 809 (1951). — Strehler, B. L., and J. R. Totter: Arch. of Biochem. a. Biophysics **40**, 28 (1952). — Thomas, E. D., F. B. Hershey, A. M. Abbate and I. R. Loufbourow: J. of Biol. Chem. **196**, 575 (1952). — Turba, F., u. M. Turba: Naturwiss. **38**, 189 (1951). — Umbreit, W. W., R. H. Burris and J. F. Stauffer: Manometric Techniques and Tissue Metabolism. Minneapolis: Burgess Publishing Co. 1949. — Vishniac, W., and S. Ochoa: J. of Biol. Chem. **198**, 501 (1952). — Warburg, O.: Amer. J. Bot. **35**, 194 (1948). — Z. Elektrochem. **55**, 447 (1951). — Warburg, O., u. G. Krippahl: Angew. Chem. **66**, 493 (1954). — Warburg, O., G. Krippahl, W. Buchholz u. W. Schröder: Z. Naturforsch. **8b**, 675 (1953). — Wassink, E. C., u. J. Rombach: Proc. Kon. Akad. Wetensch., Amsterd. C **57**, 493 (1954). — Wassink, E. C., J. F. G. M. Wintermans u. J. E. Tjia: Proc. Kon. Akad. Wetensch., Amsterd. C **54**, 3, 496 (1951). — Whatley, F. R., M. B. Allen and D. I. Arnon: Biochim. et biophysica Acta **16**, 607 (1955). — Windisch, F., E. Herfurt u. G. Rühle: Z. Naturforsch. **10b**, 254 (1955). — Wintermans, J. F. G. M., u. J. E. Tjia: Proc. Kon. Acad. Wetensch. Amsterd. C **55**, 34 (1952). — Zetterström, R., u. M. Ljunggren: Acta chem. scand. (Copenh.) **5**, 291 (1951).

Lotte Schwinck, Hannover, Botanisches Inst. d. Tierärztlichen Hochschule

Aufnahmebedingungen

Die Arbeit muß dem Gebiet der Zeitschrift angehören und wissenschaftlich Neues bringen. Arbeiten, die ausschließlich praktischen Zwecken dienen, scheiden aus.

Bei Arbeiten aus Instituten ist eine Erklärung des Direktors oder eines Abteilungsleiters beizufügen, daß er mit der Publikation der Arbeit aus dem Institut bzw. der Abteilung einverstanden ist und den Verfasser auf die Aufnahmebedingungen aufmerksam gemacht hat.

Das Manuskript muß leicht leserlich geschrieben und völlig druckfertig sein; andernfalls sind Verzögerungen im Erscheinen unvermeidlich. Korrekturen im Satz müssen auf das sachlich Notwendige beschränkt werden.

Für die Rechtschreibung ist die „Wissenschaftliche Rechtschreibung nach JANSEN" maßgebend, mit der die Schreibung der Termini im „Handwörterbuch der Naturwissenschaften" (Jena 1931—1934) im wesentlichen übereinstimmt. Wenn nötig, wird die Angleichung durch die Herausgeber bzw. durch die Druckerei vorgenommen.

Die Darstellung soll möglichst kurz sein. Ergebnisse dürfen nicht gleichzeitig in Tabellen- und Kurvenform dargestellt werden.

Die Abbildungen sind auf das Notwendigste zu beschränken, insbesondere die Reproduktion von Photographien. Einzelfiguren einer Abbildung sind, falls es sich um Vorlagen für Strichätzungen handelt, wenn möglich so zusammenzustellen, daß sie in *einem* Klischee bei gleicher Verkleinerung reproduziert werden können. Buchstaben u. a. sind mit Bleistift beizufügen.

Die Texte zu den Abbildungen sind auf eigenem Blatt gesammelt beizugeben.

Bei einleitenden Literaturbesprechungen soll möglichst auf zusammenfassende Darstellungen verwiesen und nur das zum unmittelbaren Verständnis Notwendige gebracht werden.

Der Arbeit ist eine Zusammenfassung der wichtigsten Ergebnisse im Umfang von im allgemeinen höchstens 1 Seite anzufügen.

Zu den Literaturverzeichnissen: Bei Zeitschriftenartikeln sollen der Titel sowie erste und letzte Seite angegeben werden. In den Titeln von Büchern aller Sprachen sollen, zur Kennzeichnung gegenüber Artikeln in Zeitschriften, Substantiva wie Adjektiva groß, dagegen in den Abkürzungen von Zeitschriftentiteln die Substantiva groß und die Adjektiva klein geschrieben werden (z. B. Cell Res., aber cell. Physiol.).

Einführung in die Atomphysik

Von **Wolfgang Finkelnburg**, Honorarprofessor an der Universität Erlangen. Vierte, verbesserte und ergänzte Auflage. Mit 266 Abbildungen. XI, 545 Seiten Gr.-8°. 1956. Ganzleinen DM 45.—

Inhaltsübersicht: Einleitung. — Atome, Ionen, Elektronen, Atomkerne, Photonen. — Atomspektren und Atombau. — Die quantenmechanische Atomtheorie. — Die Physik der Atomkerne. — Physik der Moleküle. — Festkörper — Atomphysik. — Tabelle der für die Atomphysik wichtigsten Konstanten und Beziehungen. — Sachverzeichnis.

Aus den Besprechungen der dritten Auflage: . . . Der Verfasser bezeichnet das Werk als eine Einführung, und er bemüht sich um eine anschauliche Darstellung unter Wahrung der physikalischen Exaktheit. Zweifellos hat er hierin eine Meisterschaft erreicht, welche den außerordentlichen Erfolg des Buches begründet. Ein besonderer Vorzug des Werkes liegt in einer eingehenden Darstellung der experimentellen Methoden, welche die modernste Entwicklung (z. B. Transistorphysik, Laufzeitmethoden der Massenspektroskopie) einschließt. Aber auch die Behandlung der Theorie eröffnet — durchweg unter Vermeidung ausführlicher Rechnungen — den Weg in das Verständnis der für die Behandlung atomphysikalischer Probleme entwickelten Wellen- und Quantenmechanik . . .

Professor Gerthsen-Karlsruhe in „Angewandte Chemie"

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Seit 1912 besteht die vom **Springer-Verlag** geschaffene Organisation für

die medizinischen und biologischen Referatenblätter

Die Referatenblätter (Zentralblätter) erfüllen die Aufgabe, in rascher, zuverlässiger und vollständiger Weise über die

einschlägige Weltliteratur

zu berichten.

Jeder Referent erhält grundsätzlich nur das Referat über Arbeiten auf solchen Gebieten zugewiesen, die er auf Grund eigener wissenschaftlicher Arbeit spezialistisch beherrscht.

Folgende Gebiete werden von den Referatenblättern erfaßt:

Wissenschaftliche Biologie
Physiologie und experimentelle Pharmakologie
Pathologie
Innere Medizin und Grenzgebiete
Kinderheilkunde
Tuberkuloseforschung
Chirurgie und Grenzgebiete
Gynäkologie und Geburtshilfe sowie Grenzgebiete
Neurologie und Psychiatrie
Haut- und Geschlechtskrankheiten sowie Grenzgebiete
Ophthalmologie und Grenzgebiete
Hals-, Nasen- und Ohrenheilkunde sowie Grenzgebiete
Radiologie

Der Bandpreis, der zurzeit erscheinenden 13 biologisch-medizinischen Zentralblätter **beträgt** mit Ausnahme des „Zentralblatt für Tuberkuloseforschung" **DM 68,—**. Die Anzahl der im Laufe eines Jahres erscheinenden Bände jedes Zentralblattes richtet sich nach dem Umfang der zu referierenden Weltliteratur.

Bestellungen nimmt jede wissenschaftl. Buchhandlung des In- u. Auslandes entgegen.

Auskünfte werden gern erteilt.

SPRINGER-VERLAG / BERLIN · GÖTTINGEN · HEIDELBERG

Diesem Heft liegen zwei Prospekte des Springer-Verlages, Berlin · Göttingen · Heidelberg, bei

Springer-Verlag, Berlin - Göttingen - Heidelberg. — Druck der Universitätsdruckerei H. Stürtz AG., Würzburg
Printed in Germany